

Unterschiede in der Signaltransduktion bei mutierten konstitutiv-aktiven TSH-Rezeptoren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von:

Alexandra Ana Stephan, geb. Boisnard

geb. am 13.11.1984 in Bukarest

angefertigt an der

Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Klinik und Poliklinik für Endokrinologie und Nephrologie

Betreuer:

Frau Prof. Dr. Dr. med. Dagmar Führer

PD. Dr. rer. nat. Knut Krohn

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom:

28.02.2017

Inhaltsverzeichnis

1.	Bibliographische Beschreibung	3
2.	Einleitung	4
2.1	Definition, Epidemiologie, Symptomatik der Schilddrüsenautonomie	4
2.2	Der TSHR	6
2.2.1	Aktivierung des TSHRs	7
2.2.2	Downstream-Signaltransduktion des TSHRs	8
2.3	Mutationen im TSHR- Gen	8
2.3.1	Aktivierende TSHR Mutationen	8
2.3.2	Relevanz von somatischen Mutationen für die Entstehung der SD-Autonomie und spezifische konstitutiv-aktivierende TSHR-Mutationen (L629F, Del 613-621, A623I)	9
2.3.2.1	L629F (TTG -> TTT)-TSHR	11
2.3.2.2	Del 613-621-TSHR	11
2.3.2.3	A623I (GCC -> ATC)-TSHR	12
2.4	Mögliche alternative intrazelluläre Signaltransduktionsproteine und Signaltransduktionswege für TSHR-Mutanten	12
2.4.1	cAMP-PKA Signalweg	13
2.4.2	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) Signalweg	13
2.4.3	IP3-DAG Weg	14
2.4.4	Rat sarcoma-Protein (Ras)- Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) Signaltransduktionsweg	14
2.4.5	Ras related protein (Rap)	15
2.4.6	Ras-related in brain protein (Rab)	15
2.4.7	Exchange protein directly activated by cAMP (Epac)	16
3.	Fragestellung der Arbeit	17
4.	Literaturverzeichnis der Einleitung	19
5.	Publikation	24
6.	Zusammenfassung	37
7.	Anlagen	41
7.1	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	41
7.2	Danksagung	42
7.3	Lebenslauf	43

1. Bibliographische Beschreibung

Stephan, geb. Boissard, Alexandra Ana

Unterschiede in der Signaltransduktion bei mutierten konstitutiv-aktiven TSH-Rezeptoren
Universität Leipzig, Dissertation

44 S.¹, 55 Lit.², 2 Abb., 1 Publikation

Referat:

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine experimentelle Untersuchung zu Unterschieden in der Signaltransduktion von drei mutierten Thyrotropin-Rezeptoren (mTSHR), die in Rattenschilddrüsenzellen stabil exprimiert werden. Mittels Proteomanalyse konnte die Proteinexpression von mehreren Signalproteinen quantitativ untersucht werden und mit der Proteinexpression in Zellen, die Wildtyp (WT)-Rezeptoren exprimieren, verglichen werden. In den Zellen mit mutierten Rezeptoren konnte eine gesteigerte Expression von Proteinen nachgewiesen werden, die in der Endozytose eine Schlüsselrolle spielen. Weiterhin konnte hier eine verstärkte Internalisierung der mTSHR festgestellt werden. Der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) Signalweg wurde in mTSHR-Schilddrüsenzellen im Vergleich zu WT-Zellen verstärkt aktiviert, und dies geschah Proteinkinase A (PKA) -unabhängig. Zudem konnte eine vorübergehende Aktivierung des Proteins Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) durch das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) nachgewiesen werden, die möglicherweise mit der Aktivierung des PI3K-Signalwegs in Zusammenhang steht.

Die Ergebnisse gewähren somit neue Einblicke in die biologische Aktivität von mTSHR. Zum einen bleiben wahrscheinlich die mTSHR nach Internalisierung weiterhin aktiv, zum anderen reduziert sich die weitere Signaltransduktion nicht nur auf cAMP-PKA/Inositoltrisphosphat-Signalwege. Diese Ergebnisse könnten zu einem besseren Verständnis für den Verlauf der Schilddrüsenautonomie beitragen.

¹ Seitenzahl insgesamt

² Zahl der im Literaturverzeichnis ausgewiesenen Literaturangaben

2. Einleitung

2.1 Definition, Epidemiologie, Symptomatik der Schilddrüsenautonomie

Die funktionelle Schilddrüsen-Autonomie ist durch ein Thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH)-unabhängiges Wachstum und Funktion des Schilddrüsengewebes charakterisiert. Sie ist die häufigste Ursache für die Entstehung von manifesten Hyperthyreosen in Gebieten mit unzureichender Jodversorgung (ca. 60 Prozent der Fälle) (Krohn, Führer, 2005), und kann mit einer Volumenzunahme der Schilddrüse (SD), der Struma, assoziiert sein.

Als molekulargenetische Ursache der SD-Autonomie sind aktivierende Mutationen des TSH-Rezeptors (TSHR)-Gens sowie der Gene, die α -Proteinuntereinheiten kodieren, bekannt (Paschke, 1997).

Die autonomen Areale der SD entziehen sich dem hypophysären Regelkreis und erscheinen szintigraphisch als „heiße“ Knoten, die vorwiegend gutartig sind. SD-Knoten können solitär oder multinodulär vorliegen und werden anhand ihrer Funktion in „kalt“, „normal“ oder „heiß“ klassifiziert. Diese Terminologie bezieht sich auf die jeweilige Aufnahme von Jod bzw. Pertechnat in der SD-Szintigraphie und entspricht der Hypo-, Normal- oder Hyperfunktion des knotigen Areals. Multinoduläre Strumen haben häufig Anteile von hyper-, eu- und hypofunktionalem Gewebe (Knudsen, 2000).

Paraklinisch zeigt sich:

1. eine euthyreote Lage: laborchemisch normwertiges TSH und normwertige periphere Schilddrüsenhormonspiegel (fT3 (freies Triiodthyronin) und fT4 (freies Thyroxin)) oder
2. eine latente Hyperthyreose, das heißt ein normaler peripherer Hormonspiegel jedoch mit erniedrigtem bzw. supprimiertem TSH-Spiegel oder
3. eine manifeste Hyperthyreose, also erhöhte fT3- und fT4-Werte mit einem supprimierten TSH-Spiegel.

Es wurde weiterhin ein direkter Zusammenhang zwischen der Jodzufuhr und der Prävalenz von SD-Autonomien festgestellt, die in Jodmangelgebieten viel höher ist als in jenen mit ausreichender Jodversorgung. Die Volumenzunahme und die Wachstumsrate der Knoten sind dabei variabel und nur teilweise durch ausreichende, therapeutische Jodzufuhr beeinflussbar. In der SHIP-Studie wurde 2003 die Prävalenz von SD-Funktionsstörungen in einem deutschen Jodmangelgebiet untersucht, in dem seit 1993 durch entsprechende Gesetzgebung die Jodsubstitution im Speisesalz erfolgte. Die Daten wurden zwischen 1997 und 2001 erhoben. Es

zeigten sich bei 35,2 Prozent der Teilnehmer eine Struma und bei 20,2 Prozent knotige Veränderungen der SD, wobei die Prävalenz bei jüngeren Generationen, die eine adäquate Jodzufuhr erhielten, über die Jahre abnahm (Völzke, 2003).

Höheres Lebensalter, genetische Faktoren, Tabakkonsum, das Körpergewicht und das weibliche Geschlecht begünstigen ebenfalls die Entwicklung von nodulären Veränderungen der SD (Knudsen, 2002).

Die Stoffwechsellage von Patienten mit multinodulärer Struma kann euthyreot bleiben, wobei die Entwicklung zu einer hyperthyreoten Stoffwechsellage oder zur toxischen multinodulären Struma auch nach mehreren Jahrzehnten möglich ist. Floride Hyperthyreosen werden durch eine akute Exposition mit hohen Jodiddosen (jodhaltige Medikamente, Röntgenkontrastmittel) provoziert. Die Wahrscheinlichkeit einer jodinduzierten Hyperthyreose steigt mit der Menge des autonomen Gewebes und mit dem Patientenalter (Papi, 2014).

Patienten mit einer Struma fallen durch einen vergrößerten Halsumfang auf, bei fortdauernder Volumenzunahme kommt es zu Schluckbeschwerden, Stridor und zu einer oberen Einflusstauung. Besteht eine Hyperfunktion, klagen Patienten vor allem über Reizbarkeit, innere Unruhe und Wärmeintoleranz. Weitere Symptome sind Schwitzen, Palpitationen, Gewichtsverlust, warme und feuchte Tegumente, Diarrhö und Polyurie. Diese Veränderungen werden insbesondere bei jüngeren Patienten festgestellt (Papi, 2014). Eine latente Hyperthyreose wird hingegen häufiger bei älteren Patienten diagnostiziert und macht sich, neben einem erniedrigten TSH-Spiegel, ggf. durch eine Neigung zum Vorhofflimmern und eine geringere Knochendichte bemerkbar (Kim, 2014).

Die zweithäufigste Ursache der Hyperthyreose in Deutschland, die als Differentialdiagnose in Erwägung gezogen werden muss, ist der Morbus Basedow. Hierbei kommt es zu einer abnormalen Bildung von Antikörpern im Organismus, die sich an die TSH-Rezeptoren der Schilddrüsenzellen binden und sie dadurch aktivieren (TSHR-Antikörper, TRAK). Infolgedessen werden die Zellen angeregt, kontinuierlich Schilddrüsenhormone zu sezernieren (Gurgul, 2011).

2.2 Der TSHR

Der TSHR zählt zu der Familie der Guanosintriphosphat (GTP)-Binding-Protein (G-Protein)-gekoppelte-Rezeptoren (GPCR), die membranintegrierte Proteine sind, und einen ähnlichen molekularen Aufbau besitzen. Sie bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette, die die Lipidschicht der Membran siebenmal durchläuft. So entstehen sieben Transmembranhelices bzw. transmembranäre Domänen (TMD), die durch drei extrazellulären Schleifen (extracellular loops (ECL)) und drei intrazellulären Schleifen (intracellular loops (ICL)) miteinander verbunden sind. Die Polypeptidkette wird durch einen cytosolischen C-Terminus und einen extrazellulären N-Terminus abgegrenzt (Rapoport, 1998) (siehe Abb.1).

Die Superfamilie der GPCR wird in drei Subfamilien (Subkategorie A, B, C) unterteilt. Der TSHR gehört zur Subkategorie A, den Rhodopsin-ähnliche Rezeptoren. Weitere Vertreter dieser Subkategorie sind β_2 -Adrenerge-Rezeptoren, Gonadotropin Releasing Hormone-Rezeptoren (GnRHR), Luteinisierende Hormone-Rezeptoren (LHR) und Follicle Stimulating Hormone-Rezeptoren (FSHR) (Shacham, 2001). Innerhalb dieser Unterteilung wird TSHR zusammen mit FSHR und LHR der Subfamilie der Glykoprotein Hormon-Rezeptoren (GPHR) zugeordnet (Rapoport, 1998).

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass der Rezeptor aus einer extrazellulären Einheit (A-Untereinheit oder extrazellulären Domäne (ECD)), die hydrophil und ca. 50 kDa groß ist, und einer hydrophoben B-Untereinheit, die etwa 35 kDa umfasst, besteht (Loosfelt, 1992). Die B-Untereinheit besteht aus den Transmembranhelices und dem cytosolischen Terminus (Sanders, 1997).

Die GPHR haben als spezifisches Strukturmerkmal eine lange ECD (350 Aminosäuren), die aus einer Leucin-reichen Domäne (leucine rich repeats (LRR)) besteht, welche eine hohe spezifische Bindung an den Proteinliganden aufweist (Neumann, 2005), und einer Gelenkregion, welche die LRR mit der TMD verbindet (Kleinau, Müller, 2011).

Der TSHR wird auf dem Chromosom 14 durch zehn Exone kodiert, die mehr als 10 kb umfassen. Die extrazelluläre Domäne wird durch die ersten neun Exone kodiert, das transmembranäre Segment und der C-Terminus durch das zehnte Exon (Paschke, 1997). Die extrazelluläre Domäne, Gelenkregion und ECL sind für die TSH-Bindung verantwortlich, die transmembranäre Domäne hingegen für die G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion (Sanders, 1997).

2.2.1 Aktivierung des TSHRs

Die Funktion des TSHRs besteht, genauso wie bei allen GPCRs, aus einer spezifischen Ligandenbindung, der darauffolgenden Aktivierung und der entsprechenden Signaltransduktion innerhalb der Zelle. Der Ligand -in dem Fall Thyrotropin (TSH)- bindet anhand von Interaktionen zwischen spezifischen Aminosäuren zu der LRR-Domäne und bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors (Gether, 2002). Dabei wurde gezeigt, dass die sogenannte Gelenkregion des Rezeptors eine entscheidende Rolle im Rahmen der Hormonbindung, Rezeptoraktivierung und Signaltransduktion aufweist (Müller, 2008).

Die inaktive Form wird vermutlich durch Interaktionen zwischen der ECD, den ECL (Zhang, 2000) und zwischen den TMD stabilisiert. Während der Aktivierung findet eine gegenseitige Positionsänderung der TMD statt, währenddessen eine Rotation der 6. TMD angenommen wird. Die neue Struktur wird durch neue hydrophobe Interaktionen stabilisiert (Kleinau, Hoyer, 2011). Viele der bekannten aktivierenden Mutationen im TSHR wurden in der Gelenkregion des Rezeptors, und in der 6. TMD beschrieben, was für die Schlüsselrolle der beiden Regionen bei der Rezeptoraktivierung spricht (Kleinau, Hoyer, 2011, Kleinau, Müller, 2011).

Die aktive Konformation scheint zudem durch Interaktionen mit intrazellulären Effektorproteinen (z. B. G-Proteine, siehe unten) stabilisiert zu werden. Das begünstigt bei anderen GPCRs die Aufrechterhaltung einer konstanten (basalen) Aktivität des Rezeptors, die auch in Abwesenheit des Liganden im physiologischen Zustand nachgewiesen wurde (Yao, 2009). Diese basale Aktivität ist bei dem TSHR besonders ausgeprägt und scheint auch für die Aktivierung des Inositoltrisphosphat (IP₃)-Signalwegs in Abwesenheit des Liganden wichtig zu sein (Kleinau, 2007, Kleinau, 2014).

Ähnlich wie bei anderen GPCRs wurde auch für den TSHR die Organisation in Dimeren bzw. Oligomeren nachgewiesen (Latif, 2001). Dies scheint für die Rezeptorexpression an der Oberfläche zwingend notwendig zu sein, und spielt bei der Hormonbindung, Signaltransduktion genauso wie bei der Erhaltung der konstitutiven Aktivität des Rezeptors eine Rolle (Persani, 2007). Es wurde gezeigt, dass dieser Prozess unabhängig von konstitutiv-aktivierende Mutationen des Rezeptors stattfindet (Kleinau, 2013).

2.2.2 Downstream-Signaltransduktion des TSHRs

Die TMDs besitzen spezifische Interaktionsstellen für G-Proteine, damit die Signaltransduktion möglich ist. Die G-Proteine sind an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran lokalisiert. Es gibt verschiedene Arten von G-Proteinen, die spezifische intrazelluläre Signaltransduktionswege stimulieren, wie z. B. stimulatory G-Protein (Gs), welches die Adenylatzyklase aktiviert, und Gq Protein, welches mit der Phospholipase C (PLC) gekoppelt ist. Alle genannten Proteine besitzen eine ähnliche trimerische Struktur mit einer α -Untereinheit und einem $\beta\gamma$ -Komplex. Der Rezeptor koppelt dabei mit der α -Fraktion des G-Proteins, die GTP statt GDP bindet. Infolgedessen werden durch eine Konformationsänderung aktivierende Domänen zur Verfügung gestellt, die ihre Wirkung auf weitere Signaltransduktionswege ausüben (Vassart, 1992).

Bei einer normalen TSH-Konzentration wird über den TSHR das Gs-Protein aktiviert. Bei höheren TSHR-Konzentrationen wird eine andere Rezeptorkonformation übernommen, die das Gq-Protein aktiviert, dementsprechend die PLC-Kaskade stimuliert und eine Erhöhung der Produktion von Diacylglycerol (DAG) und IP₃ bewirkt (Laurent, 1987, Algeier, 1994).

Der zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP)-Signalweg ist vor allem für die Kontrolle der Funktion, d. h. die Synthese und Sekretion von SD-Hormonen sowie die Wachstumsregulation verantwortlich, währenddessen der PLC-Signalweg bei der Kontrolle der Iodination eine entscheidende Rolle spielt (Corvilain, 2001).

2.3 Mutationen im TSHR- Gen

2.3.1 Aktivierende TSHR Mutationen

Genmutationen können zu einem Zugewinn der Funktion des kodierten Proteins führen (Gain Of Function). Im Fall des TSHRs können Mutationen eine Aktivierung des Rezeptors in Abwesenheit des Liganden (TSH) bewirken. Diese Mutationen werden als konstitutiv-aktivierende Mutationen bezeichnet.

Die aktivierenden Mutationen des TSHRs werden je nach Entstehung in somatische Mutationen und Keimbahnmutationen unterteilt. Die **somatischen** Mutationen entstehen in der Ontogenese innerhalb einer einzigen Zelle und führen durch Vermehrung der betroffenen Zelle zur Entstehung eines heißen Knotens oder autonomer Areale in einer Knotenstruma (Krohn, Führer, 2005). Im nachfolgenden Kapitel sollen diese ausführlicher beschrieben werden.

Von den somatischen Mutationen lassen sich **Keimbahnmutationen** abgrenzen. Sie sind angeboren, bestehen in allen Zellen des Organismus, und werden somit auch vom gesamten Schilddrüsengewebe exprimiert. Diese Mutationen verursachen ebenfalls eine Stimulation der Hormonproduktion über die konstitutive TSHR-Aktivierung. Die Keimbahnmutationen können als hereditäre, familiäre Hyperthyreose (familial non-autoimmune hyperthyroidism FNAH) vorliegen und werden autosomal-dominant vererbt oder sie können als *de novo* Mutationen entstehen (sporadic non-autoimmune hyperthyroidism SNAH) (Hebrant, 2011).

2.3.2 Relevanz von somatischen Mutationen für die Entstehung der SD-Autonomie und spezifische konstitutiv-aktivierende TSHR-Mutationen (L629F, Del 613-621, A623I)

Als funktionelle Autonomie werden Wachstumsprozesse des SD-Gewebes bezeichnet, die sich der Feedback-Regulation der Hypophyse entziehen. Die Autonomie kann unifokal (autonomes Adenom), multifokal (Knotenstruma) oder verteilt (disseminierte Autonomie) vorliegen. Bei Erreichen eines kritischen Autonomievolumens wird durch TSH-Suppression die Hormonproduktion des übrigen SD-Gewebes unterdrückt. Die gesamte Hormonproduktion der SD kann sich über einen Zeitraum von Jahren im Normbereich (euthyreoter Zustand) bewegen oder bei zunehmender Aktivität der autonomen Areale sich in einen hyperthyreoten Zustand verändern (Krohn, Führer, 2005).

Die Entstehung der Autonomien steht in einem engen Zusammenhang mit Jodmangel. In jodarmen Regionen wie beispielsweise Jütland (Dänemark), treten häufiger Fälle von toxischen Adenomen und multinodulären Strumen auf als in Island oder Japan, wo die Jodzufuhr ungleich höher ist (Krohn, Führer, 2005).

Zur Bedeutung der Jodzufuhr für die Pathogenese von SD-Knoten und der SD-Autonomie wird gegenwärtig folgende Hypothese diskutiert: Durch eine unzureichende Jodversorgung wird die Schilddrüsenhormonproduktion nicht optimal abgedeckt. Als Gegenreaktion wird vermehrt TSH aus der Hypophyse freigesetzt. Damit soll die Produktion von Hormonen gesteigert und das Zellwachstum stimuliert werden. In der Folge führt das zu einer Volumenzunahme der SD um die mangelnde Hormonproduktion zu kompensieren (Corvilain, 2001).

Die Stimulation der Hormonproduktion bewirkt zudem eine vermehrte Entstehung von Wasserstoffperoxid in der Zelle und eine vermehrte Bildung von freien Radikalen, die neben der hohen Proliferationsrate, ein günstiges Milieu für das Auftreten von somatischen Mutationen schaffen. Dieser Prozess wird durch die Wirkung von mehreren Wachstumsfaktoren - Insulin-

like growth factor (IGF-I), Transforming growth factor- β (TGF- β), Epidermal growth factor (EGF) begünstigt, die in der wachsenden Struma vermehrt produziert werden (Krohn, Führer, 2005).

Alle genannten Faktoren führen dazu, dass die Mutationsrate in der SD acht- bis zehnmal höher ist, als in anderen Organen (Maier, 2006). Mit Hilfe der Einzelgelelektrophorese und Immunhistochemie kann nachgewiesen werden, dass die oxidativen DNA-Läsionen eine Ursache der häufigen Mutationen sind. Dafür spricht auch, dass der häufig auftretende Austausch von Basenpaaren (G-T und T-C) in Schilddrüsengewebe am wahrscheinlichsten durch oxidativen Stress induziert wird (Maier, 2006).

Physiologischerweise lässt sich der TSHR nur durch TSH in eine aktivierte Konformation versetzen. Der mutierte Rezeptor befindet sich hingegen permanent und TSH-unabhängig in einer solchen Konformation, die als „gain-of-function“ bezeichnet wird, und eine kontinuierliche Stimulation der Zelle durch TSH imitiert (Corvilain, 2001). Damit wird eine fortdauernde Aktivierung der cAMP-Kaskade erreicht. Solche mutierten Zellen wurden bereits in kleinen mikroskopischen Läsionen euthyreoter Strumen festgestellt (Krohn, 2000), und lassen die Schlussfolgerung zu, dass diese als Ursprung für heiße Knoten gelten.

Aufgrund der beschleunigten Wachstumsrate werden die punktförmigen Mutationen vermutlich häufiger manifest, als DNA-Reparaturmechanismen entgegenwirken können und führen zur Entstehung eines neuen autonomen Phänotyps. Zu den häufigsten Mutationen, die zu einer Autonomie der Zellen führen, zählen Mutationen des TSH-Rezeptors (57 bis 80 Prozent), seltener die der Gs α Proteinuntereinheit (Duprez, 1997).

Eine ähnliche Pathogenese wird auch bei **multinodulären Strumen** vermutet, bei denen autonome Areale parallel an verschiedenen Lokalisationen innerhalb der SD auftreten. In einigen Fällen wurden unterschiedliche Mutationen in verschiedenen, gleichzeitig existierenden Knoten festgestellt (Krohn, 1998).

Bisher wurden 99 aktivierende Mutationen, davon drei TSHR-Gen-Deletionen untersucht. Diese sind in der „TSH Receptor Database“ erfasst. Die Datenbank wird mit jeder neu publizierten Mutation ergänzt, einschließlich ihrer ausführlichen Charakterisierung (vgl. <http://endokrinologie.uniklinikum-leipzig.de/tsh/index.php>, Zugriff am: 14.10.2015).

Diese Arbeit setzt sich ausschließlich mit der Signaltransduktion der TSHR Mutationen L629F, A623I und Del 613-621 auseinander, daher werden im folgenden Kapitel diese ausführlicher beschrieben (siehe Abb. 1).

2.3.2.1 L629F (TTG -> TTT)-TSHR

Bei dieser Mutation wird im TSHR Gen aufgrund der Substitution der DNA-Base Guanin durch Thymin an Position 629 die Aminosäure Leucin zu Phenylalanin ersetzt (6.TMD). Die 6.TMD spielt aufgrund ihrer Konformationsänderung unmittelbar nach der Rezeptoraktivierung eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion. Die Untersuchungen an L629F-TSHR transfizierten Affennierenzellen (COS-7 Zellen) ergaben folgende Ergebnisse: L629F-TSHR bewirkt eine Erhöhung des basalen cAMP-Spiegels, aber nicht von IP3. Mit der TSH-Stimulation steigt sowohl cAMP als auch IP3 (Parma, 1997).

2003 wurde von Führer et al. die biologische Aktivität des L629F-TSHR in stabilen Klonen von Ratten-Thyreozyten (FRTL-5 Zellen) untersucht, und mit anderen mutierten TSHR (mTSHR) verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass der L629F-TSHR verschiedene Eigenschaften der Zelle beeinflusst: Einerseits dass die Kolonien eine gemischte Morphologie entwickelten, andererseits, dass das Zellwachstum nur wenig zugenommen hatte (Führer, 2003).

2.3.2.2 Del 613-621-TSHR

In diesem Fall findet ein Verlust von mehreren Basenpaaren statt, was zur Deletion von 9 Aminosäuren zwischen Position 613 und 621 im TSHR führt. Die Deletion befindet sich im 3. ICL des TSHRs, die die Weiterleitung des Signals an die Gs Protein vermittelt. Wurde der Del613-621-TSHR in Zellen transfiziert, wurde ein fünf- bis sechsfacher Anstieg des cAMP-Spiegels im Vergleich zum Wildtyp(WT)-TSHR festgestellt. Die starke Aktivierung des mTSHRs unterstützt die Hypothese, dass die durch die Deletion betroffenen Regionen entscheidend für die Beibehaltung des selbst-inhibierenden Zustands sind (Führer 1997).

Wonerow et al. hatten ferner die cAMP- und IP3-Spiegel entsprechend bei verschiedenen mTSHR, einschließlich Del 613-621-TSHR und L629F-TSHR, untersucht. Interessanterweise besitzt der Del 613-621-TSHR eine konstitutive Aktivität für beide Kaskaden (cAMP und IP3) und bietet wahrscheinlich Aktivierungsstellen sowohl für Gs als auch für Gq an.

2.3.2.3 A623I (GCC -> ATC)-TSHR

Diese Mutation wurde erstmals 1993 von Parma et al. beschrieben. Dabei werden Guanin und Cytosin im TSHR Gen durch Alanin und Thymin substituiert, daraufhin wird an der Position 623 der Aminosäure Alanin mit Isoleucin ersetzt. Die Mutation befindet sich ebenfalls auf der 6. TMD und wurde in einer Studie von Führer 2003 analog wie die zwei vorigen beschriebenen Mutation in COS-7 Zellen, FRTL-5 Zellen und in humanen Thyreozyten untersucht.

In FRTL-5 Zellen wurde durch die Transfektion des A623I-TSHR ein 1,5-facher Anstieg von cAMP im Vergleich zu WT-TSHR-Zellen erzeugt. Nach zusätzlicher TSH-Stimulation der Zellen wurde zudem ein 2,5-facher Anstieg von cAMP in den Zellen mit dem A623I-TSHR im Vergleich zu WT-TSHR-Zellen festgestellt.

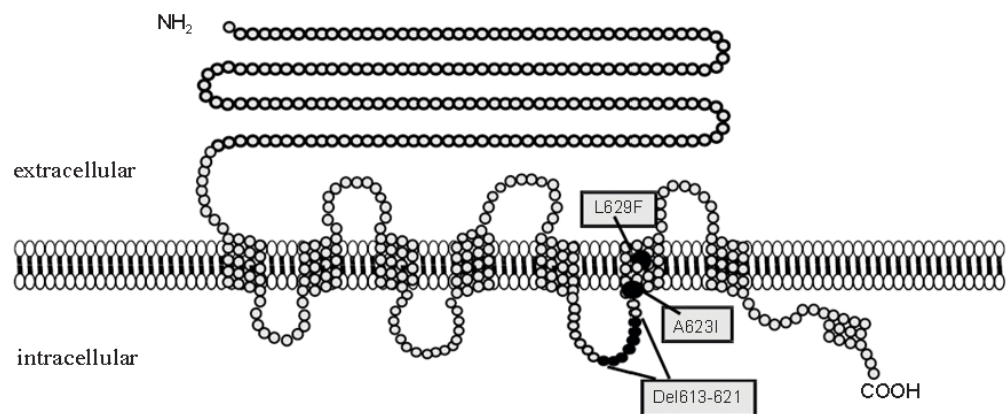


Abbildung 1: Schematische Darstellung des TSHRs mit Lokalisation von Mutationen

2.4 Mögliche alternative intrazelluläre Signaltransduktionsproteine und Signaltransduktionswege für TSHR-Mutanten

Aufgrund der verschiedenen biologischen Aktivitäten der Mutanten wurde in dieser Arbeit eine Analyse der Proteinexpression in FRTL-5 Zellen durchgeführt, die stabile TSHR-Mutanten an ihrer Oberfläche exprimierten. Dabei wurden zahlreiche Signalkaskaden und -wege untersucht, die möglicherweise auch in der mTSHR Signaltransduktion präsent sind. Um diesen Aspekt besser zu verdeutlichen, folgt zunächst ein kurzer allgemeiner Überblick von Proteinen, die generell in der Signaltransduktion eine Rolle spielen (siehe Abb. 2, Seite 16).

2.4.1 cAMP-PKA Signalweg

Der zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP)-Signalweg wird durch das Gs-Protein aktiviert. Nach der TSH-Bindung am Rezeptor aktiviert die α -Untereinheit die Adenylatzyklase und bewirkt eine Akkumulation von cAMP. Die hohe Konzentration von cAMP führt dann zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) (Vassart, 1992).

Die PKA besteht aus zwei katalytische Untereinheiten und zwei Regulatoruntereinheiten. Bisher wurden vier Typen von katalytischen ($C\alpha$, $C\beta$, $C\gamma$, Prkx) und vier Typen von regulatorischen Einheiten identifiziert: $RI\alpha$ und $RI\beta$, $RII\alpha$ und $RII\beta$ (Calebiro, 2006). Nach der Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten werden die aktivierten, katalytischen Einheiten in das Zytoplasma freigesetzt. Dort phosphorylieren sie spezifische Zielproteine und steuern dadurch deren Funktion.

Die regulatorische Untereinheit $RI\alpha$ des PKA (PRKAR1A) hat vermutlich eine signifikante Funktion bei der Signaltransduktion. Sie fungiert als Tumorsuppressorgen und wird mit der Entstehung einer multiplen endokrinen Neoplasie, dem Carney Complex, in Verbindung gebracht. Die Patienten entwickeln Adenome oder Karzinome von mindestens zwei endokrinen Organen: Nebennierenrinde, Hypophyse, Schilddrüse, Testikel oder Ovar. Zudem fallen die Patienten durch Lentigines, Myxome und Schwannome auf (Kirschner, 2000).

2.4.2 Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) Signalweg

Der PI3K-Signalweg spielt eine zentrale Rolle für das Zellwachstum und die Steuerung der Proliferation und Apoptose der Zellen. Durch die Stimulation des jeweiligen Rezeptors (z. B. durch Wachstumshormon) wird auch das Protein PI3K aktiv, die wiederum das Proteinkinase B (PKB) indirekt aktiviert. Die PKB (auch Akt genannt) kehrt im aktiven Zustand in das Zytoplasma zurück, um dort entsprechende Zielproteine zu phosphorylieren (Liang, 2003).

Ein wichtiger downstream Effektor des PI3K-Akt-Signalwegs ist mammalian Target Of Rapamycin (mTOR). Das Protein wurde in den letzten Jahren intensiver erforscht, nachdem die Effekte seines Hemmstoffes Rapamycin auf das Zellwachstum erkannt wurden. mTOR ist eine Serin-Threonin-Kinase, die in dem Mittelpunkt eines Netzwerks von vielen Signalkaskaden steht und eine Schlüsselrolle in vielen zellulären Prozessen spielt, u. a. Zellwachstum und -überleben, Zellstoffwechsel, Zellmotilität und Apoptose (Dobashi, 2011).

Einer der Effektoren von mTOR ist p70S6K (70 kDa große ribosomales Protein S6-Kinase), die in Prozessen wie Proteinsynthese, Zellwachstum und -überleben aktiv ist (Zhou H., 2011).

2.4.3 IP3-DAG Weg

Der TSHR besitzt die Eigenschaft das Gq-Protein zu aktivieren. Weiterhin wird die PLC aktiviert, die durch ihre Lipase-Aktivität, das Phosphatidylinositol-4-5-bisphosphat in DAG und IP3 spaltet. Die Hauptfunktion von IP3 ist die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma, das wiederum viele zellulären Prozesse, wie z. B. Exozytose von Vesikeln oder Aktivierung von Transkriptions-faktoren vermittelt (Vassart, 1992).

2.4.4 Rat sarcoma-Protein (Ras)- Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) Signaltransduktionsweg

Es werden derzeit fünf Unterfamilien von Signalproteinen unterschieden, die alle, aufgrund ihrer ähnlichen Struktur und Funktion, zu der **Ras-Superfamilie** gehören: Ras, Rho, Rab, Ran und Arf (Roscioni, 2008).

Das Ras-Protein befindet sich auf der Innenseite der Zellmembran, und zählt zur GTP-asen Superfamilie. Diese Proteine wechseln zwischen dem aktiven GTP-gebundenen und dem inaktiven GDP-gebundenen Zustand (Kolch, 2005).

Im aktiven Zustand bewirkt Ras eine serielle Kaskade von Aktivierungen durch sequentielle Phosphorylierungen. Dies vollzieht sich innerhalb der MAPK-Kaskade, die aus drei Kinasen besteht, welche in der Evolution nahezu unverändert geblieben ist. Die Phosphorylierungen finden jeweils an Serin/Threonin- bzw. Thyrosinresten statt, die innerhalb der Proteine immer durch eine Aminosäure getrennt sind.

Die erste Proteinkinase, die durch Ras aktiviert wird, heißt MAP-Kinase-Kinase-Kinase (oder Raf bei Säugetieren). Sie aktiviert wiederum die MAP-Kinase-Kinase (oder MEK bei Säugetieren) die entsprechend die MAP-Kinase (mit den zwei Isoformen p42/p44 MAPK oder extracellular-signal-regulated kinase (ERK) 1/2, bei Säugetieren) phosphoryliert. Die MAP-Kinase ist zugleich für die Stimulation von Genregulatoren verantwortlich, die z. B. eine weitere Proteinsynthese initiieren können (Kolch, 2000).

Ras besitzt die Eigenschaft sich mit hoher Affinität an Raf zu binden, da Raf zwei Domänen innerhalb seines N-Terminus besitzt, mit denen es mit Ras interagieren kann: Ras-binding domain (RBD) und Cystein-Rich-domain (CRD). Der RBD bewirkt die Translokation von Raf vom Zytosol hin zur Zellmembran, wo es die MAPK-Kaskade initiiert, daneben ist CRD vermutlich für die Aktivierung von Raf verantwortlich. Mehrere Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass die aktivierende Bindung zwischen Ras und Raf durch PKA in Ratten-SD-Zellen inhibiert werden kann. Damit wird die Aktivierung der MAPK-Kaskade verhindert. Gleichzeitig scheint Ras die PKA-Aktivität zu inhibieren, was zu einer Inhibierung der Zelldifferenzierung führt (Medina, 2000).

2.4.5 Ras related protein (Rap)

Rap ist eine kleine Ras ähnliche GTP-ase, die in ihrer GTP gebundenen Form verschiedene Kinasen aktiviert u. a. Raf-1 und B-Raf, die zum MAPK-Signalweg zugeordnet werden (Richards, 2001). Zunächst wurde es als ein Inhibitor der Ras-bedingten Aktivierung von B-Raf (Kolch, 2000) beschrieben, in der aktuellen Literatur wird jedoch seine Rolle in der Zelldifferenzierung betont (Tsygankova, 2001).

2.4.6 Ras-related in brain protein (Rab)

Die Rab-Familie zählt ebenfalls zur GTP-asen Superfamilie. In ihrer aktiven Form haften die Proteine an der zytosolischen Seite von verschiedenen intrazellulären Membranen, in ihrer inaktiven Form befinden sie sich im Zytosol. Als aktive GTP-ase bindet Rab verschiedene Effektoren, die in den zellulären Vesikeltransport mit einwirken, wie z. B. Motorproteine für Vesikeln oder filamentöse Proteine, welche gezielte Bewegung von Vesikeln steuern. Auf diese Weise regulieren Rab-GTP-asen die Bildung, Bewegung und Membranfusion von Vesikeln (Stenmark, 2001).

2.4.7 Exchange protein directly activated by cAMP (Epac)

Epac sind Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (Guanine nucleotide exchange factors (GEFs)) die durch Stimulation des GDP-GTP Wechsels vorwiegend die Rap1-GTP-ase aktivieren. Sie werden PKA unabhängig direkt von cAMP aktiviert. Dadurch befindet sich Epac an einem wichtigen Kreuzungspunkt von verschiedenen Signaltransduktionswegen und intrazellulären Regulationsmechanismen, wie z. B. Calcium-Homöostase, Proliferation, Zelldifferenzierung, Zell-Zell-Adhäsion, Gen-Transkription, Sekretion, Ionen-Transport und neuronaler Signalisierung. Bisher wurden in Untersuchungen zwei Isoformen der Epac identifiziert: Epac1 und Epac2. Letztgenanntes wird vorwiegend in Nerven und Nebennierengewebe vermehrt exprimiert (Kawasaki, 1998).

Das Epac1-Protein besitzt eine N-terminale Dishevelled-Egl-10-Pleckstrin-Domäne (DEP-Domäne), eine cAMP-Bindungsdomäne (cAMP-B), sowie eine C-terminale GEF-Domäne. Die DEP-Domäne ist für die Membranlokalisation des Proteins verantwortlich und positioniert Epac in der Nähe von anderen Enzymen wie PI3K oder PKB.

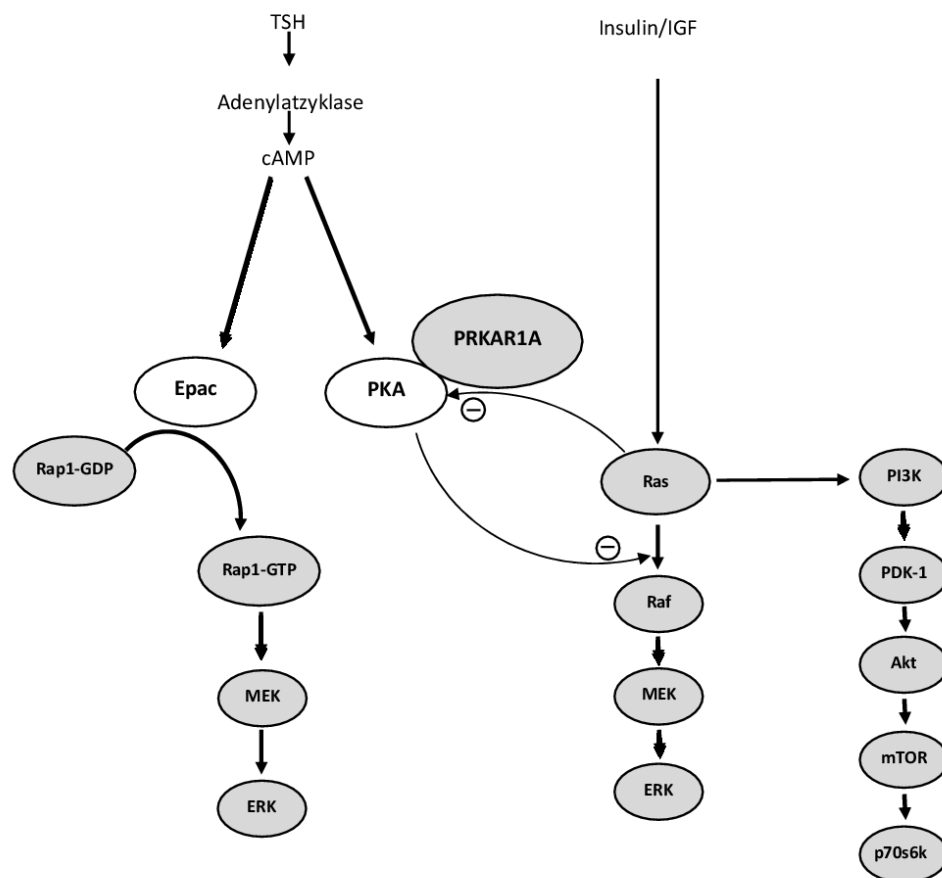


Abbildung 2: Schematische Darstellung von möglichen Signaltransduktionswegen in der SD-Zelle

3. Fragestellung der Arbeit

In Deutschland wird die Hyperthyreose häufig durch SD-Autonomien hervorgerufen. Sie äußern sich unter anderem durch knotige Veränderungen an der SD, deren Entstehung überwiegend auf aktivierende Mutationen des TSHR-Gens zurückzuführen ist. Bisher wurden 99 Mutationen identifiziert, welche zu einer konstitutiven Aktivierung des TSHRs führen.

Es konnte bisher weder bei den somatischen Mutationen noch bei den Keimbahnmutationen eine Korrelation zwischen dem klinischen Phänotyp *in vivo* (d. h. Schwere der Hyperthyreose und Größe der SD-Knoten) und der jeweiligen konstitutiven Aktivität der mTSHR *in vitro* festgestellt werden (Arturi, 2003, Lueblinghoff, 2011). Das liegt möglicherweise an verschiedenen Faktoren, die den Krankheitsverlauf *in vivo* beeinflussen, wie z. B. die Jodaufnahme oder eine genetische Veranlagung (Corvilain, 2001), aber auch an der Tatsache, dass die konstitutive Aktivität der mTSHR vorwiegend in Nicht-SD-Zellen untersucht wurde.

In funktionellen Untersuchungen von COS-7 Zellen, welche verschiedene mTSHRs exprimieren, konnte eine unterschiedlich starke Stimulation des cAMP-Signalwegs festgestellt werden, vereinzelt auch des IP3-Signalwegs (Van Sande, 1995). In humanen SD-Zellen hingegen wurden Mechanismen der Rückkopplung nachgewiesen, die das angestiegene cAMP abbauen (van Staveren, 2006, Persani, 2000). Der zelluläre Kontext spielt also eine entscheidende Rolle bei der Entschlüsselung der Signaltransduktion der mTSHRs im autonomen Gewebe.

Führer et al. hatten in einer vorangegangenen Arbeit im Jahr 2003 einen Vergleich zwischen der biologischen Funktion von mTSHR in COS-7 Zellen und Rattenschilddrüsenzellen (FRTL-5 Zellen) durchgeführt. Erstmals wurden auch mTSHR-transfizierte humane SD-Zellen untersucht. Dabei wurden Wirkungen auf den cAMP-Signalweg, Stimulation von Wachstum und Differenzierung erforscht. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die biologische Aktivität von mTSHR in Schilddrüsenzellen eindeutig von denen in COS-7 Zellen unterschied, was die Frage nach der Rolle von alternativen Signalwegen, z. B. der PI3K- oder der Ras-MAPK-Signalweg, in den SD-Zellen offen lässt. Somit wird erneut unterstrichen, dass die Ergebnisse von Charakterisierungen der biologischen Aktivität von mTSHRs *in vitro* nicht auf *in vivo* Verläufe übertragen werden können.

Aufbauend auf den bisherigen Ergebnissen wurde innerhalb der vorliegenden Untersuchung die Signaltransduktion von mTSHR näher analysiert. Dabei wurden Ratten SD-Zelllinien (FRTL5), die stabil folgenden mTSHR exprimieren, verwendet: Del 613-621(Del), A623I (623) und L629F (629) und im Vergleich zu FRTL-5 Zellen mit Expression von WT-TSHR charakterisiert.

Neben der Analyse der cAMP- und IP-Signalwege wurde ferner der Fragestellung nach dem

Zusammenspiel von zusätzlichen Signalkaskaden nachgegangen. Dazu gehören der MAPK-Signalweg, PI3K/Akt-Signalweg und die Rezeptorendozytose, die in dieser Arbeit vorgestellt werden.

4. Literaturverzeichnis der Einleitung

- Arturi F, Scarpelli D, Coco A, Sacco R, Bruno R, Filetti S, Russo D** 2003. Thyrotropin receptor mutations and thyroid hyperfunctioning adenomas ten years after their first discovery: unresolved questions. *Thyroid*. 13: 341-343
- Calebiro D, de Filippis T, Lucchi S, Martinez F, Porazzi P, Trivellato R, Locati M, Beck-Peccoz P, Persani L** 2006. Selective modulation of protein kinase A I and II reveals distinct roles in thyroid cell gene expression and growth. *Mol Endocrinol*. 20: 3196-3211
- Corvilain B, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G** 2001. Somatic and germline mutations of the TSH receptor and thyroid diseases. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 55:143-158
- Dobashi Y, Watanabe Y, Miwa C, Suzuki S, Koyama S** 2011. Mammalian target of rapamycin: a central node of complex signaling cascades. *Int J Clin Exp Pathol*. 4: 476-495
- Duprez L, Parma J, Costagliola S, Hermans J, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G** 1997. Constitutive activation of the TSH receptor by spontaneous mutations affecting the N-terminal extracellular domain. *FEBS Lett*. 409: 469-474
- Führer D, Holzapfel HP, Wonerow P, Scherbaum WA, Paschke R** 1997. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene and not in the Gs alpha protein gene in 31 toxic thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab*. 82: 3885-3891
- Fuhrer D, Lewis MD, Alkhafaji F, Starkey K, Paschke R, Wynford-Thomas D, Eggo M, Ludgate M** 2003. Biological activity of activating thyroid-stimulating hormone receptor mutants depends on the cellular context. *Endocrinology*. 144: 4018-4030.
- Gether U, Asmar F, Meinild AK, Rasmussen SG** 2002. Structural basis for activation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Toxicol*. 91: 304-312
- Gurgul E, Sowinski J** 2011. Primary hyperthyroidism--diagnosis and treatment. Indications and contraindications for radioiodine therapy. *Nucl Med Rev Cent East Eur*. 14: 29-32
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM** 1998. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science*. 282: 2275-2279
- Kim YA, Park YJ** 2014. Prevalence and risk factors of subclinical thyroid disease. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 29: 20-29
- Kleinau G, Biebermann H** 2014. Constitutive activities in the thyrotropin receptor: regulation and significance. *Adv Pharmacol*. 70: 81-119

- Kleinau G, Claus M, Jaeschke H, Mueller S, Neumann S, Paschke R, Krause G** 2007. Contacts between extracellular loop two and transmembrane helix six determine basal activity of the thyroid-stimulating hormone receptor. *J Biol Chem.* 282: 518-525
- Kleinau G, Hoyer I, Kreuchwig A, Haas AK, Rutz C, Furkert J, Worth CL, Krause G, Schüle R** 2011. From molecular details of the interplay between transmembrane helices of the thyrotropin receptor to general aspects of signal transduction in family a G-protein-coupled receptors (GPCRs). *J Biol Chem.* 286: 25859-25871
- Kleinau G, Mueller S, Jaeschke H, Grzesik P, Neumann S, Diehl A, Paschke R, Krause G** 2011. Defining structural and functional dimensions of the extracellular thyrotropin receptor region. *J Biol Chem.* 286: 22622-22631
- Kleinau G, Neumann S, Grüters A, Krude H, Biebermann H** 2013. Novel insights on thyroid-stimulating hormone receptor signal transduction. *Endocr Rev.* 34: 691-724
- Knudsen N, Laurberg P, Perrild H, Bülow I, Ovesen L, Jørgensen T** 2002. Risk factors for goiter and thyroid nodules. *Thyroid.* 12: 879-888
- Knudsen N, Perrild H, Christiansen E, Rasmussen S, Dige-Petersen H, Jørgensen T** 2000. Thyroid structure and size and two-year follow-up of solitary cold thyroid nodules in an unselected population with borderline iodine deficiency. *Eur J Endocrinol.* 142: 224-230
- Kolch W** 2000. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J.* 351: 289-305
- Kolch W, Calder M, Gilbert D** 2005. When kinases meet mathematics: the systems biology of MAPK signalling. *FEBS Lett.* 579: 1891-1895
- Krohn K, Führer D, Holzapfel HP, Paschke R** 1998. Clonal origin of toxic thyroid nodules with constitutively activating thyrotropin receptor mutations. *J Clin Endocrinol. Metab.* 83: 130-134.
- Krohn K, Wohlgemuth S, Gerber H, Paschke R** 2000. Hot microscopic areas of iodine-deficient euthyroid goitres contain constitutively activating TSH receptor mutations. *J Pathol.* 192: 37-42
- Krohn K, Führer D, Bayer Y, Eszlinger M, Brauer V, Neumann S, Paschke R** 2004. Molecular pathogenesis of euthyroid and toxic multinodular goiter. *Endocr Rev.* 26: 504-524
- Latif R, Graves P, Davies TF** 2001. Oligomerization of the human thyrotropin receptor: fluorescent protein-tagged hTSHR reveals post-translational complexes. *J Biol Chem.* 276: 45217-45224

- Laurent E, Mockel J, Van Sande J, Graff I, Dumont JE** 1987. Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid. *Mol Cell Endocrinol.* 52: 273-278
- Loosfelt H, Pichon C, Jolivet A, Misrahi M, Caillou B, Jamous M, Vannier B, Milgrom E** 1992. Two-subunit structure of the human thyrotropin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 3765-3769
- Lueblinghoff J, Eszlinger M, Jaeschke H, Mueller S, Bircan R, Gozu H, Sancak S, Akalin S, Paschke R** 2011. Shared sporadic and somatic thyrotropin receptor mutations display more active in vitro activities than familial thyrotropin receptor mutations. *Thyroid.* 21: 221-229
- Maier J, van Steeg H, van Oostrom C, Karger S, Paschke R, Krohn K** 2006. Deoxyribonucleic acid damage and spontaneous mutagenesis in the thyroid gland of rats and mice. *Endocrinology.* 147: 3391-3397
- Medina DL, Santisteban P** 2000. Thyrotropin-dependent proliferation of in vitro rat thyroid cell systems. *Eur J Endocrinol.* 143: 161-178
- Mueller S, Kleinau G, Jaeschke H, Paschke R, Krause G** 2008. Extended hormone binding site of the human thyroid stimulating hormone receptor: distinctive acidic residues in the hinge region are involved in bovine thyroid stimulating hormone binding and receptor activation. *J Biol Chem.* 283: 18048-18055
- Neumann S, Claus M, Paschke R** 2005. Interactions between the extracellular domain and the extracellular loops as well as the 6th transmembrane domain are necessary for TSH receptor activation. *Eur J Endocrinol.* 152: 625-634
- Papi G, Corsello SM, Pontecorvi A** 2014. Clinical concepts on thyroid emergencies. *Front Endocrinol (Lausanne).* 5:102
- Parma J, Duprez L, Van Sande J, Cochaux P, Gervy C, Mockel J, Dumont J, Vassart G** 1993. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature.* 365: 649-651
- Parma J, Duprez L, Van Sande J, Hermans J, Rocmans P, Van Vliet G, Costagliola S, Rodien P, Dumont JE, Vassart G** 1997. Diversity and prevalence of somatic mutations in the thyrotropin receptor and Gs alpha genes as a cause of toxic thyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 82: 2695-2701
- Paschke R, Ludgate M** 1997. The thyrotropin receptor in thyroid diseases. *N Engl J Med.* 337: 1675-1681

Persani L, Calebiro D, Bonomi M 2007. Technology Insight: modern methods to monitor protein-protein interactions reveal functional TSH receptor oligomerization. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 3: 180-190

Persani L, Lania A, Alberti L, Romoli R, Mantovani G, Filetti S, Spada A, Conti M 2000. Induction of specific phosphodiesterase isoforms by constitutive activation of the cAMP pathway in autonomous thyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 85: 2872-2878

Rapoport B, Chazenbalk GD, Jaume JC, McLachlan SM 1998. The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies. *Endocr Rev.* 19: 673-716

Richards JS 2001. New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Mol Endocrinol.* 15: 209-218

Roscioni SS, Elzinga CR, Schmidt M 2008. Epac: effectors and biological functions. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 377: 345-357

Van Sande J, Parma J, Tonacchera M, Swillens S, Dumont J, Vassart G 1995. Somatic and germline mutations of the TSH receptor gene in thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab.* 80: 2577-2585

Sanders J, Oda Y, Roberts SA, Maruyama M, Furmaniak J, Smith BR 1997. Understanding the thyrotropin receptor function-structure relationship. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 11: 451-479

Shacham S, Topf M, Avisar N, Glaser F, Marantz Y, Bar-Haim S, Noiman S, Naor Z, Becker OM 2001. Modeling the 3D structure of GPCRs from sequence. *Med Res Rev.* 21: 472-483

van Staveren WC, Solís DW, Delys L, Venet D, Cappello M, Andry G, Dumont JE, Libert F, Detours V, Maenhaut C 2006. Gene expression in human thyrocytes and autonomous adenomas reveals suppression of negative feedbacks in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 413-418

Stenmark H, Olkkonen VM 2001. The Rab GTPase family. *Genome Biol.* 2: REVIEWS3007

Tall GG, Barbieri MA, Stahl PD, Horazdovsky BF 2001. Ras-activated endocytosis is mediated by the Rab5 guanine nucleotide exchange activity of RIN1. *Dev Cell.* 1: 73-82

Tsygankova OM, Saavedra A, Rebhun JF, Quilliam LA, Meinkoth JL 2001. Coordinated regulation of Rap1 and thyroid differentiation by cyclic AMP and protein kinase A. *Mol Cell Biol.* 21: 1921-1929

Vassart G, Dumont JE 1992. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev.* 13: 596-611

Vlaeminck-Guillem V, Ho SC, Rodien P, Vassart G, Costagliola S 2002. Activation of the cAMP pathway by the TSH receptor involves switching of the ectodomain from a tethered inverse agonist to an agonist. *Mol Endocrinol*. 16: 736-746

Völzke H, Lüdemann J, Robinson DM, Spieker KW, Schwahn C, Kramer A, John U, Meng W 2003. The prevalence of undiagnosed thyroid disorders in a previously iodine-deficient area. *Thyroid*. 13: 803-810

Wonerow P, Chey S, Führer D, Holzapfel HP, Paschke R 2000. Functional characterization of five constitutively activating thyrotrophin receptor mutations. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 53: 461-478

Zhang M, Tong KP, Fremont V, Chen J, Narayan P, Puett D, Weintraub BD, Szkudlinski MW 2000. The extracellular domain suppresses constitutive activity of the transmembrane domain of the human TSH receptor: implications for hormone-receptor interaction and antagonist design. *Endocrinology*. 141: 3514-3517

Zhou H, Huang S 2011. Role of mTOR signaling in tumor cell motility, invasion and metastasis. *Curr Protein Pept Sci*. 12: 30-42

Yao XJ, Vélez Ruiz G, Whorton MR, Rasmussen SG, DeVree BT, Deupi X, Sunahara RK, Kobilka B 2009. The effect of ligand efficacy on the formation and stability of a GPCR-G protein complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106: 9501-9506

5. Publikation

Titel:

Comparative proteomic analysis to dissect differences in signal transduction in activating TSH receptor mutations in the thyroid.

Autoren:

Krause K, Boissard A, Ihling C, Ludgate M, Eszlinger M, Krohn K, Sinz A, Fuhrer D

Bibliographie:

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 44 (2012) 290-301



Comparative proteomic analysis to dissect differences in signal transduction in activating TSH receptor mutations in the thyroid

Kerstin Krause^{a,1}, Alexandra Boissard^{a,1}, Christian Ihling^b, Marian Ludgate^c, Markus Eszlinger^a, Knut Krohn^a, Andrea Sinz^b, Dagmar Fuhrer^{d,*}

^a Clinic for Endocrinology and Nephrology, University of Leipzig, Liebigstr. 20, D-04413 Leipzig, Germany

^b Department of Pharmaceutical Chemistry & Bioanalytics, Institute of Pharmacy, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Wolfgang-Langenbeck-Str. 4, D-06120 Halle (Saale), Germany

^c Centre for Endocrine and Diabetes Sciences, School of Medicine, Cardiff University, Heath Park, Cardiff CF14 4XN, UK

^d Department of Endocrinology and Metabolism, Division of Laboratory Research, University Hospital Essen, Hufelandstr. 55, 45147 Essen, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 May 2011

Received in revised form 9 October 2011

Accepted 27 October 2011

Available online 3 November 2011

Keywords:

Thyroid hormone stimulating receptor (TSHR)

cAMP signaling

Toxic thyroid nodules

2D-DIGE proteomics

Mass spectrometry

ABSTRACT

In the thyroid, cAMP controls both thyroid growth and function. Gain-of-function mutations in the thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) lead to constitutive cAMP formation and are a major cause of autonomous thyroid adenomas. The impact of activating TSHR mutations on the signal transduction network of the thyrocyte is not fully understood.

To gain more insights into constitutive TSHR signaling, rat thyrocytes (FRTL-5 cells) with stable expression of three activating TSHR mutants (mutTSHR: A623I, L629F and Del613–621), which differ in their functional characteristics *in vitro*, were analyzed by a quantitative proteomic approach and compared to the wild-type TSHR (WT-TSHR). This study revealed (1) differences in the expression of Rab proteins suggesting an increased TSHR internalization in mutTSHR but not in the WT-TSHR; (2) differential stimulation of PI3K/Akt signaling in mutTSHR vs. WT-TSHR cells, (3) activation of Epac, impairing short-time Akt phosphorylation in both, mutTSHR and WT-TSHR cells.

Based on the analysis of global changes in protein expression patterns, our findings underline the complexity of gain-of-function TSHR signaling in thyrocytes, which extends beyond pure cAMP and/or IP formation. Moreover, evidence for augmented endocytosis in the mutTSHR, adds to a new concept of TSHR signaling in thyroid autonomy. Further studies are required to clarify whether the observed differences in Rab, PI3K and Epac signaling may contribute to differences in the phenotypic presentation, i.e. stimulation of function and growth of thyroid autonomy *in vivo*.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The TSH receptor (TSHR) couples to multiple G proteins (Laugwitz et al., 1996) but most of the effects of TSH are mediated through Gs α and cAMP (Kimura et al., 2001; Medina and Santisteban, 2000). cAMP activates multiple downstream targets, including PKA and guanine nucleotide exchange factors for Rap (de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998a) and Ras (Pak et al., 2002; Pham et al., 2000). Besides the control of differentiated functions, cAMP inhibits or stimulates cell proliferation depending on the cell

type. In the thyroid, chronic cAMP stimulation leads to toxic thyroid hyperplasia in transgenic mice (e.g. due to adenosine A2 receptor overexpression) as well as hyperthyroidism and goiter in individuals with germline gain-of-function TSHR mutations (Vassart and Dumont, 1992; Paschke and Ludgate, 1997; Corvilain et al., 2001). In addition, presence of TSHR autoantibodies also results in the chronic activation of the TSHR (Morshed et al., 2009). Somatic activating TSHR mutations can be found in 60% of patients with toxic thyroid nodules. Functional characterization of TSHR mutants is usually performed in COS-7 cells, a non-thyroid cell system, and shows that the mutants differ in their potency to activate G α and Gq signaling. The *in vitro* findings however do not correlate with the biological behaviour of the respective mutants *in vivo*. We have previously shown that the biological effects of TSHR mutations must be investigated in the correct cellular context and that biological net effects in terms of stimulation of thyroid growth and function cannot be deduced purely on measurement of second messengers (Fuhrer et al., 2003). Thus it is likely that still unknown signaling

Abbreviations: PKA, protein kinase A; GEF(s), guanine nucleotide exchange factor(s); EPAC, exchange proteins activated by cAMP; MAPK, mitogen activated protein kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; 8-CPT, 8-CPT-2-O-Me-cAMP.

* Corresponding author. Tel.: +49 201 723 2821.

E-mail address: Dagmar.fuhrer@uk-essen.de (D. Fuhrer).

¹ These authors contributed equally to this study.

Table 1

Summary of biological properties of the used mTSHR and the TSHR-WT.

cAMP:	623 > 629 > Del > WT > Neo
IP:	Del > 623 > 629 > WT/Neo
hTSHR copy number:	WT > Del > 629 > 623 > Neo
DNA synthesis:	629 > Del > WT > 623 > Neo
Growth:	623 > 629 > Del > WT/Neo

Adapted from [Führer et al. \(2003\)](#).

mechanisms, e.g. exerting a counter-regulatory effect could contribute to the biological impact. In addition, TSHR signaling to cascades alternative to cAMP-PKA and IP-PKC must be considered.

In this paper we aimed to decipher constitutive TSHR signaling in the thyroid using a proteomic approach, since this allows a comprehensive analysis of global changes in protein expression which might reflect the biological situation more adequately than mRNA expression analysis. As a model we chose previously characterized FRTL-5 cell clones with stable expression of three different gain-of-function TSHR mutations ([Führer et al., 2003](#)). In addition, this model has been recently used to demonstrate a modulatory effect of TSH on calcium signaling ([Lorenz et al., 2010](#)). Besides the wild-type TSHR (WT-TSHR) we used the A623I (623), L629F (629) and Del613-621 (Del) TSHR mutants, which are all located within the exon 10 encoded transmembrane domain of the TSHR and which differ in their degree of constitutive activation of cAMP and inositol phosphate formation ([Wonerow et al., 2000](#); [Führer et al., 2003](#)). To decipher the differences in signaling triggered by the different activating mutations, we used two dimensional differential in-gel electrophoresis (2D-DIGE) analysis with targeted Western blot analysis for confirmation, followed by in vitro validation of the detected differential stimulation of PI3K/Akt and MAPK pathways. These data provide first evidences for differences between the mutants in receptor endocytosis and the stimulation of PI3K/Akt and MAPK pathways by PKA-dependent and -independent signaling cascades.

2. Materials and methods

2.1. Plasmids and retroviral gene transfer

We have studied the SB5 sub-clone of FRTL-5 cells stably expressing the wild-type (WT) TSHR or 3 different gain-of-function TSHR mutants, A623I, L629F and Del613-621, introduced by retroviral infection as previously described ([Führer et al., 2003](#)). The empty plasmid served as control (Neo). Briefly, the cDNAs of the human TSHR mutants A623I, L629F, Del613-621 and the TSHR-WT were subcloned into the pLNSX vector. For retroviral transduction the 'Phoenix' transient retroviral producer packaging cell line was used ([Danos and Mulligan, 1988](#)). Retroviral supernatants were harvested at 48 h after transfection and assessed for (1) retroviral titers in human epithelial cell line A431; (2) TSHR expression by specific [¹²⁵I]TSH binding of G418 selected A431 colonies; and (3) cell surface expression in the human thyroid cell line hOR13 by flow cytometry using the polyclonal TSHR Ab p60 as described before ([Führer et al., 2003](#)). Twenty-four hours after retroviral infection, FRTL-5 cells were passaged and selected under two conditions: (1) G418 resistance and (2) G418 resistance plus TSH withdrawal (4H medium). In each of four separate infection experiments, all FRTL-5 clones/retroviral construct were pooled ([Führer et al., 2003](#)). [Table 1](#) summarizes the biological properties of the mutTSHR and the TSHR-WT and the empty vector control (Neo).

2.2. Cell culture and stimulation

Cells were split into 10 cm dishes with 1×10^6 cells/dish (in triplicates) and maintained in 5H medium consisting of 2:1:1

mixture of DMEM:Ham's F12:MCDB104 (all from Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 5% calf serum (Life Technologies), 10 µg/ml insulin, 0.4 µg/ml hydrocortisone (Merck Biosciences, Darmstadt, Germany), 45 µg/ml ascorbic acid, 5 µg/ml transferrin and 5 mU/ml bovine TSH (all from Sigma-Aldrich, Munich, Germany).

After 24 h of growing, cells were starved for 48 h in 5H medium containing 0.2% calf serum without TSH. Afterwards they were stimulated with 250 µM isobutylmethylxanthine (IBMX; Sigma-Aldrich) for 4 h. Cells were then washed with PBS and shock-frozen in liquid nitrogen.

For analysis of the PI3K/Akt or MAPK pathway, cells were grown in 6-well plates (3×10^5 /well). For activation of adenylyl cyclase, after 3 days cells were stimulated with 10 µM forskolin for 5 min. For inhibition of PKA, PI3K or mTOR, cells were incubated with 10 µM H89, 10 µM LY294002 or 10 µM Rapamycin 60 min before stimulation with 10 µM H89 for 5 min. Forskolin and H89 were from Sigma-Aldrich (Munich, Germany), LY294002 and Rapamycin were obtained from Merck Biosciences (Darmstadt, Germany) and 8-pCPT-2'OMe-cAMP was from BIOLOG Life Science Institute (Bremen, Germany).

2.3. Cell lysis and protein precipitation

Cells were lysed in buffer containing 10 mM Tris, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% NP-40 (all from Sigma-Aldrich). Proteins were precipitated using chloroform-methanol-precipitation. Briefly, protein samples (500 µl) were diluted with 2000 µl chloroform and 500 µl of methanol (all from Sigma-Aldrich). After vortexing, 1000 µl H₂O was added. Samples were vortexed and centrifuged at $14,000 \times g$ for 15 min at 4 °C. The aqueous top layer was removed and 400 µl methanol were added. After vortexing, samples were spun at $14,000 \times g$ for 1 min at 4 °C. The supernatant was removed and the samples were air-dried at room temperature and stored at –80 °C.

2.4. 2D-DIGE and image analysis

Precipitated protein pellets were solubilized in IPG-buffer consisting of 8 M urea, 2 M thiourea, 4% chaps, 0.5% IPG-buffer pH 3–10 and 1.2% DeStreak (all from GE Healthcare, Freiburg, Germany). The protein content was determined using the 2D Quant Kit (GE Healthcare, Freiburg, Germany) according to the manufacturer's description. For DIGE analysis the CyDye minimal labelling kit (GE Healthcare, Freiburg, Germany) was used according to the manufacturer's description. Isoelectric focussing was performed in 24 cm long non-linear pH 3–10 IPG strips (GE Healthcare, Freiburg, Germany) followed by SDS-PAGE in 8–16% gradient gels ([Krause et al., 2006](#)). All samples were run in triplicates.

Afterwards, the gels were scanned using a TyphoonTM imager (GE Healthcare). Gel analysis was performed using DeCyder 2-D Differential Analysis Software v7.0 (GE Healthcare) to co-detect, normalize and quantify the protein spots in the images. The DeCyder biological variation (BVA) module was used for comparison between the TSHR mutants and the TSHR-WT to the mixed internal standard and for the calculation of normalized spot volumes/protein abundance. The resulting spot maps corresponding to the individual gels were used to determine average abundance changes and paired Student's *t*-test *p*-values for each protein across the different gels. Protein spots which were consistently expressed across the replicate gels with a significant (Student's *t*-test, *p* < 0.05) change in abundance and at least ≥ 1.5 -fold compared to the Neo and a least ≥ 1.3 -fold change in spot quantity between the respective samples were selected for further characterization by mass spectrometry. Mass spectrometry was performed on spots which

were excised from a colloidal-stained preparative gel (Neuhoff et al., 1988).

2.5. Protein digestion and mass spectrometry

The proteins were in-gel digested following standard protocols (Shevchenko et al., 2006). Briefly, protein disulfides were reduced with DTT and cysteines were alkylated with iodoacetamide. Digestion was performed overnight using trypsin as protease. Peptide extracts were purified and concentrated using C18 ZipTips (Millipore) and spotted onto an Anchorchip MALDI target plate (MTP 384/800, Bruker Daltonik) using CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) as matrix. The samples were analyzed using an Ultraflex III MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonik, Bremen, Germany). Mass spectra in the m/z range 740–5000 were acquired in the positive ionization and reflectron mode by accumulating data from 2000 laser shots per sample (FlexControl 3.0, Bruker Daltonik, Bremen, Germany). Signals were labelled (FlexAnalysis 3.0, Bruker Daltonik, Bremen, Germany) and searched against the Swiss-Prot human database using Biotoools 3.2 (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) and Mascot server 2.2 (Matrix Science). To verify protein identifications, three ion signals of matched peptides and the 5 most intensive non-matched signals were automatically subjected to MALDI-LIFT-TOF/TOF-MS/MS experiments by applying 2000 laser shots. After processing of the fragment ion spectra, an MS/MS database search was performed (Biotoools, Mascot).

2.6. Bioinformatic analysis

The Gene Ontology Annotation database was employed to obtain information about the function and protein class of the significantly differentially expressed proteins as well as of the molecular processes they are involved in (www.geneontology.org).

2.7. Western blot analysis

After protein quantification using the BCATM Protein Assay Kit (Pierce; Rockford, USA) 30 μ g protein was separated by SDS-PAGE on 8% polyacrylamide gels. Resolved proteins were transferred to a PVDF Immobilon PSQ transfer membrane (0.2- μ m pore size) (Millipore, Watford, UK). Membranes were blocked with 5% BSA in TBST (50 mM Tris-HCl, pH 7.5 and 150 mM NaCl containing 0.05% Tween 20) for 1 h at room temperature. Membranes were then incubated overnight at 4 °C with TBST containing 5% BSA and a dilution of the following primary antibodies: rabbit p-mTOR (Ser2448) and rabbit mTOR; rabbit anti-phospho-Akt (S473) and rabbit anti-Akt; rabbit p-p70s6k (T389) and rabbit p70s6k antibody (all from Millipore, Billerica, USA). Blots were then reprobed with anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody at a dilution of 1:10.000 (Millipore, Billerica, USA) for 1 h at room temperature. Immunocomplexes were detected using SuperSignal West Dura chemiluminescent reagents (Thermo Scientific, Bonn, Germany).

2.8. Confocal laser-scanning microscopy

For confocal laser-scanning microscopy (CLSM) 2.5×10^5 cells per well were seeded on coverslips into 12-well plates. After 24 h of growing, cells were starved for 48 h in 5H medium containing 0.2% calf serum without TSH. Afterwards they were stimulated with 250 μ M isobutylmethylxanthine (IBMX; Sigma-Aldrich) for 4 h. Coverslips were rinsed two times with ice-cold PBS and fixed with 4% paraformaldehyde containing 0.1% Triton X-100 (for permeabilization) for 30 min at 4 °C. After washing $2 \times$ with PBS, the cells were incubated with the primary TSHR antibody (2C11; Serotec

Ltd., Oxford, UK; 1:500 in PBS) overnight at 4 °C. Thereafter, the cells were washed 2×5 min with PBS, and the primary antibody was detected by incubation with an Alexa-Fluor 488-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (Molecular Probes, Eugene, OR; 1:1000 in PBS) for 1 h at 4 °C. After 2×5 min in PBS, the coverslips were mounted onto glass slides.

Confocal analysis was performed on a confocal laser scanning system (TCS SP2; Leica, Wetzlar, Germany) attached to a microscope (DM IRBE; Leica) with 100 \times oil immersion lens (PL Fluotar 1.3; Leica). Optical sections (0.45 μ m) were taken, and representative sections corresponding to the middle section of the cells were presented. We investigated approximately 100 cells per coverslip, and at least 75% of the cells showed the same level of TSHR internalization. After indirect immunofluorescence staining, no specific fluorescence was observed in the Neo cells treated with anti-TSHR antibody and Alexa-Fluor 488-conjugated antibody.

3. Results

3.1. Differential protein expression in gain-of-function TSHR mutants and WT-TSHR FRTL-5 cells

In this study we aimed to identify a specific protein expression signature which may help to define the activation of specific signal nodes by gain-of-function mutations within the TSHR. We chose three gain-of-function mutations, which confer variable activation of the Gs/adenylate cyclase and/or Gq/phospholipase cascade (Fig. 1; Fuhrer et al., 2003).

These mutants and the WT-TSHR were stably expressed in FRTL-5 cells after retroviral transfection and were characterized for their biological activity in a previous study of our group (Fuhrer et al., 2003). In the present study we applied a 2D-DIGE approach to define and quantify changes in protein expression between the FRTL-5 cells with mutant TSHR (L629F, A623I, Del613-621) and wild-type TSHR. Whole cell protein extracts were prepared from the mutTSHR and the WT-TSHR cells. After labelling with the CyDyes and 2D-separation, the gels were scanned and analyzed using the DeCyder v7.0 software. Approximately, 1.500 spots were well matched across all the gels using DeCyder software analysis. Biological variation analysis identified 62 protein spots, which showed a consistent regulation in $\geq 3/4$ replicate gels with a fold change in protein expression of ≥ 1.3 and a t -test score less than 0.05. These proteins were selected for MALDI-TOF/TOF MS analysis, and a total of 55 differentially expressed proteins were successfully identified (Table 2). The changes in protein expression levels were validated by Western blot analysis for the proteins amyloid beta A4 protein, cathepsin B and the regulatory subunit p85 of the PI3-kinase (Fig. 2).

3.2. Protein ontology analysis of identified proteins

We reasoned that it might be useful to first group the identified proteins based on their “molecular function” and “biological process”, since it has been shown before that the mutTSHR differentially stimulate thyroid growth and function (Corvilain et al., 2001; Paschke and Ludgate, 1997). Therefore, the proteins of interest were annotated using Gene Ontology (GO) analysis. The term “molecular function” is the function that a protein performs on its direct molecular targets and “biological process” describes the biological systems to which a protein contributes. When differentially expressed proteins were categorized according to their molecular function, 49 proteins were implicated in binding, and 38 were grouped as being associated with catalytic function. Another group of proteins were identified to be involved in transcriptional regulation (Fig. 3A). When the identified proteins were grouped according

Table 2Changes in protein expression in FRTL-5 cells with stable expression of constitutively active TSHR mutants (A623I, L629F and Del613-621) vs. the wild-type TSHR (WT).^a

Accession ^b	Protein involved in process	pI/Mw	623/WT	629/WT	Del/WT	623/Del	629/Del	629/623
Protein synthesis and folding								
P07150	Annexin A1	6.9/38.8	1.6	2.5	2.8	−1.8	0.9	1.5
Q66HH8	Annexin A5	4.9/35.7	−2	−1.6	1.9	−3.8	−3.1	1.3
P48037	Annexin A6	5.4/75.7	1.7	2.7	1.8	0.9	1.5	1.5
P63039	60 kDa heat shock protein. Mitochondrial [precursor]	5.9/60.9	−3.5	−2.4		−3.9	−2.6	1.5
P07901	Heat shock protein HSP 90- α	4.9/84.7	−2.6	−1.7	1.4	−3.6	−2.4	1.5
P11598	Protein disulfide-isomerase A3 [precursor]	5.9/56.6	−1.6		−2.1	1.3	2.2	1.8
Q642A0	p53 and DNA damage-regulated protein 1	6.7/15.2	−2.5	−1.8	1.2	−3	−2.2	1.3
Q9CZP0	Ufm1-specific protease 1	6.2/23.4	−2.2	−1.6	1.1	−2.3	−1.7	1.4
Endocytosis								
Q6AXT5	Ras-related protein Rab-21	8.1/24.2	2.9	5.4	1.8	1.6	3.1	1.9
P35288	Ras-related protein Rab-23	6.4/26.6		1.4	2.2	−1.9	−1.6	1.1
Q53B90	Ras-related protein Rab-43	5.6/23.2	1.4	2.1	2.3	−1.6		1.5
P63012	Ras-related protein Rab-3A	4.9/25.0	1.4	2.7	2.1	−1.4	1.3	1.9
Q9JMI3	Rab5 GDP/GTP exchange factor	6.4/56.9		1.8	1.4		1.3	1.6
P97680	Ras and Rab interactor 1 (Rin1)	8.6/84.7	−1.6			−1.7		1.4
P08592	Amyloid beta A4 protein	4.7/86.7	1.9	1.7		1.5	1.3	
Transcription								
Q8BMJ18	Transcription factor Sp8	9.1/48.4	1.4	2.7	2.1	−1.4	1.3	1.9
Q62187	Transcription termination factor 1	9.4/97.7	1.5	2.3	1.8		1.3	1.5
Q853KT3	GC-rich sequence DNA-binding factor	9.1/48.4	−2.2	−1.6		−2.3	−1.7	1.4
O35819	Krueppel-like factor 6	9.4/97.7	−1.6	−2.6	−1.5		−1.7	−1.6
Signaling								
P42346	FKBP12-rapamycin complex-associated protein (mTOR)	6.7/28.9	1.7		2.1		−2.2	−1.5
P28028	B-Raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase	8.0/88.9	−1.4	−1.8	−3.4	2.4	1.9	0.8
Q63787	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha	5.9/83.5	−2.1	−1.7	−1.5			
P09456	cAMP-dependent protein kinase type I- α regulatory subunit	5.3/43.0	1.8	2.6	1.9		1.4	1.5
Q9WUL6	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14	7.3/103.0	−2.7	−1.6	1.2	−3.4	−2	1.7
Q6JPI3	Thyroid hormone receptor-associated protein 2	5.7/241.7	−2.7	−1.9		−2.7	−1.9	1.4
Q9Z2A6	Mitogen-activated protein kinase 15		2	2.7	4.1	−2	−1.5	1.4
P70365	Nuclear receptor coactivator protein 1	9.8/60.7	1.6	3.4		1.9	4	2.1
Q99P77	Nucleolar GTP-binding protein 1	5.8/157.1	1.7	1.7	5.8	−3.5	−3.5	1
O35264	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta	5.5/25.8	−2.2	−1.4	3.6	−7.9	−5.1	1.5
P62836	Ras-related protein Rap-1A (Rap1A)	6.4/21.0	1.6	2	2.5	−1.5		1.3
Q62172	RalA-binding protein 1	5.7/75.0	1.4	2.2	2	−1.4		1.5
P06768	Retinol-binding protein II. cellular	5.9/15.6		1.5			1.4	1.6
P49806	Regulator of G-protein signaling 10	8.6/77.7	2.5	4.1	4	−1.6		1.7
Q5U2Z7	Rho GTPase-activating protein 24	6.3/84.1	−1.7	1.4		−2.1		2.4
Q99LR9	Serine/threonine-protein kinase RIO3	8.1/43.4	1.8	2.2	3.2	−1.8	−1.5	
Q8CHG7	Rap guanine nucleotide exchange factor 2 (RPGF2)	9.1/126.0	−2.7	−3.3	1.3	−3.6	−4.3	
P50116	S100 calcium-binding protein A9	7.0/13.1	1.4	2.2	2	−1.4	1.1	1.5
O35814	Stress-induced-phosphoprotein 1	6.4/62.5	1.6		1.4			
P62260	14-3-3 protein epsilon	4.6/29.2	1.6	2.2	3.1	−1.9	−1.4	1.3
P35213	14-3-3 protein beta	4.8/28.0	1.8	2.7	2.2		1.2	1.5
Cell cycle								
P51945	cyclin-g1	8.9/33.9	−1.4	−1.5		−1.7	−1.8	
P61809	Cyclin-dependent kinase 5 activator 1	9.4/34.0	−3.7	−3.1	−1.7	−2.1	−1.8	
RNA metabolism/translation								
Q3B862	Eukaryotic initiation factor 4A-III	6.3/46.8	1.3	2.2	1.3		1.8	1.7
P61979	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	18723.00	−5.7	−2.7		−5.6	−2.7	2.1
Q63716	Peroxisome oxidin-1	8.2/22.1	−1.4		−1.2			
Antioxidative system								
Q35660	Glutathione S-transferase Mu 6	6.1/25.6	1.8	2.6	1.9		1.4	1.5
Q63716	Peroxisome oxidin-1	8.2/22.1		1.6	−1.6			1.3
Metabolism								
P59924	THO complex subunit 1	4.6/40.2	−1.4	1.3	1.6	−2.2	−1.3	1.7
p00787	cathepsin b	5.4/37.0		−1.5	−1.2		1.2	−1.3
Q91450	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1. Mitochondrial [precursor]	8.5/50.8	−1.4	1.4		−1.7		2
P14650	Thyroid peroxidase [precursor]	6.6/101.4	1.8	2.6	1.9		1.4	1.5
P85972	Vinculin	5.8/116.4		6.6	1.4		4.8	6.3
Q64267	DNA-repair protein complementing XP-A cells homolog	7.0/31.4	−3.7	−3.1	−1.7	−2.1	−1.8	1.2

^a Shown are spot ratios with a statistical significance in expression difference of $p < 0.05$ and ≥ 1.3 -fold changes in spot density. Ratios were calculated using the mean spot density of triplicate gels per sample. Empty field correspond either to unchanged protein expression or changes without statistical significance.^b Swiss-Prot accession number.

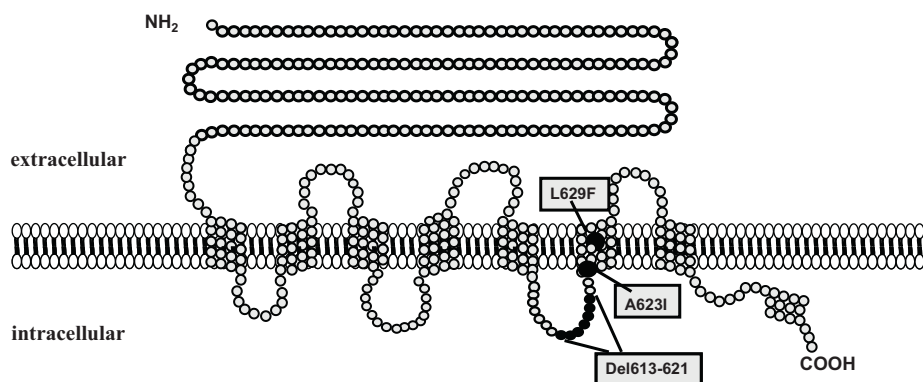


Fig. 1. Localization of the three studied TSHR mutants in the exon 10 encoded TSHR transmembrane domain. The TSHR point mutations A623I and L629F are localized in the 6th transmembrane domain and the deletion mutation Del613-621 is localized in the 3rd intracellular loop.

to the involved biological process, the major part of proteins found to be differentially regulated in mutant vs. WT-TSHR cells were proteins involved in transport, cellular communication and cellular processes (Fig. 3B).

3.3. Increased induction of endocytotic pathways by gain-of-function *mutTSHR*

Five proteins were identified to belong to the Rab family (Rab21, Rab3A, Rab43 and Rab23). The identified proteins were collectively increased in the *mutTSHR* cells compared to the WT-TSHR cells (Table 2). Furthermore, we found the Ras and Rab interactor Rin 1 as significantly decreased in the 623 mutant compared to Del (1.7-fold), 629 (1.4-fold) and the WT-TSHR cells (1.6-fold; all $p < 0.005$; Table 2). In addition, we identified the Rab5 GDP/GTP exchange factor (Rabex-5) to be overexpressed in 629 and Del *mutTSHR*

compared to the WT-TSHR cells (1.8- and 1.4-fold, respectively; Table 2 and Fig. 4).

The upregulation of Rab proteins point to an increased endocytosis in the *mutTSHR* cells but not in the WT-TSHR cells. In order to verify an increased TSHR internalization in the *mutTSHR* cells vs. the WT-TSHR cells, we performed confocal laser-scanning microscopy using a primary TSHR antibody and an Alexa-Fluor 488-conjugated secondary antibody. As demonstrated in Fig. 5, the *mutTSHR* display a shift from a patchy staining in control cells to a diffuse intracellular TSHR staining after treatment with IBMX. In contrast, the WT-TSHR shows no significant change in cellular localization after 4 h IBMX treatment (Fig. 5).

3.4. Differentially regulated proteins involved in cell transduction

3.4.1. Differential activation of proteins coupled to GPCR signaling

TSH regulates thyroid cell proliferation and function through cAMP-mediated signaling pathways that activate protein kinase A (PKA) and Epac/Rap1. In this study, we identified several proteins of the TSH-cAMP signaling, which are altered in their expression due to the constitutive activation of the TSHR. The Rap guanine nucleotide exchange factor 2 (RPGF2) and Rap1 were differentially expressed in *mutTSHR* and the TSHR-WT cells. First, Rap1 was upregulated in 623, 629 and Del *mutTSHR* vs. TSHR-WT cells (1.6-, 2- and 2.5-fold, respectively). Furthermore, the cAMP regulated Rap1 guanine nucleotide exchange factor 2 (RPGF2), which activates Rap1 was decreased in 623 and 629 *mutTSHR* compared to the WT and Del TSHR cells (Table 2).

A further protein involved in TSH mediated mitogenesis is the PKA-type 1 α regulatory subunit (PRKAR1A), the primary receptor for cAMP and regulator of PKA activity. PRKAR1A is significantly overexpressed in the *mutTSHR* compared to the TSHR-WT cells (1.8-, 2.6-, 1.9-fold for 623, 629 and Del compared to TSHR-WT; Table 2; Fig. 4). In addition the regulator of G-protein signaling 10 (RGS10) is expressed with different abundance across *mutTSHR* and cells. RGS proteins negatively regulate intracellular signaling of receptors in the G protein-coupled receptor family by accelerating the GTPase activity of the $G\alpha$ subunit. RGS10 was overexpressed in 629 (4.1-fold), Del (4-fold) and 623 (2.5-fold) *mutTSHR* cells compared to WT-TSHR cells (Table 2; Fig. 4). In contrast, B-Raf was found to be significantly overexpressed in the WT-TSHR compared to the *mutTSHR* cells (3.4-, 1.8- and 1.4-fold compared to Del, 629 and 623 *mutTSHR*, respectively; Table 2).

3.4.2. Differential activation of the PI3K/Akt pathway

Another protein we have identified using the proteomic approach was the FKBP12-rapamycin complex-associated protein (mTOR). It was upregulated in Del and 623 *mutTSHR* compared to

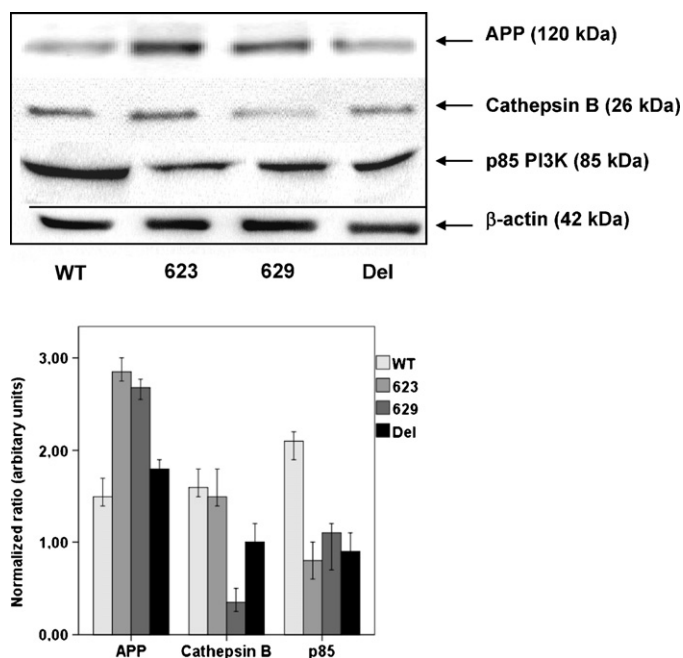


Fig. 2. Validation of 2-DE results. Western blot analysis of cell lysates from *mutTSHR* and WT-TSHR FRTL-5 cells confirms differential protein expression of the Amyloid beta A4 protein (APP), Cathepsin B, and the regulatory subunit p85 of the PI3-kinase. 50 μ g of cytosolic protein was loaded per lane. Western blot was performed with specific antibodies (Section 2). The data are presented as ratios corresponding to respective protein expression normalized to β -actin expression and are calculated as mean of triplicates \pm SEM.

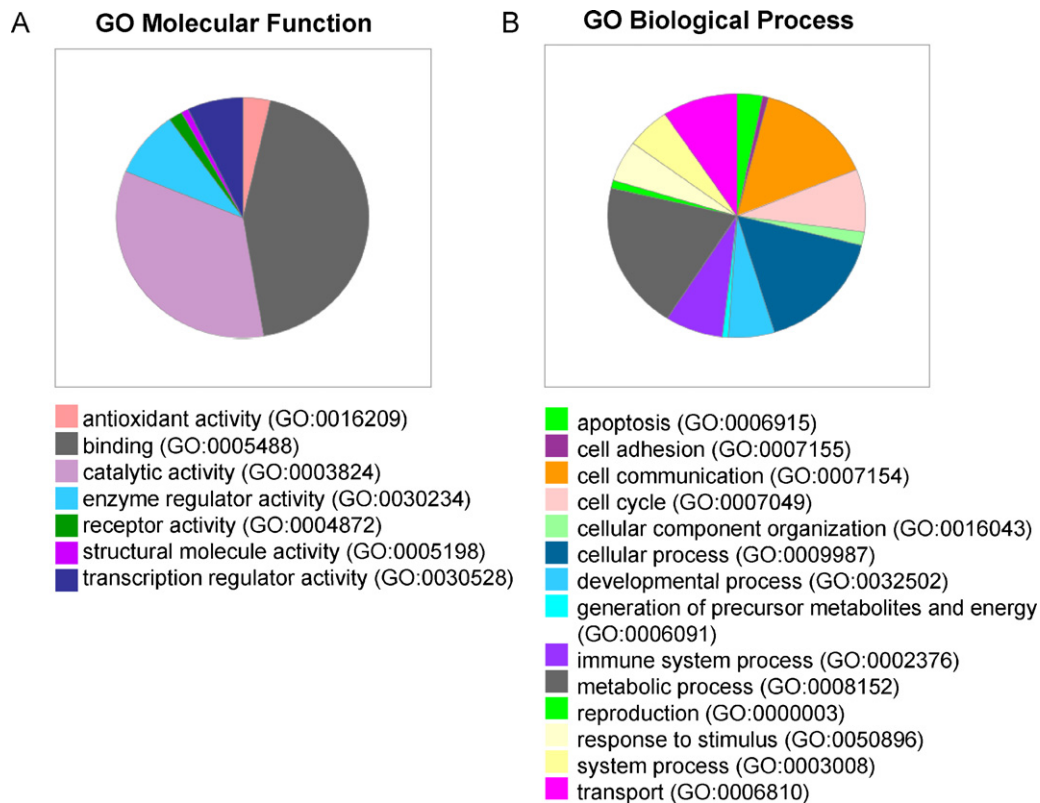


Fig. 3. Protein classification based on Gene Ontology. The 62 proteins, which were differentially regulated in mutTSHR vs. WT-TSHR FRTL-5 cells were classified into different categories based on molecular function and biological processes. “Molecular function” is the function that a protein performs on its direct molecular targets and “Biological process” represents the biological systems to which a protein contributes. The assignments are based on GO (Gene Ontology) Consortium (www.geneontology.org).

WT-TSHR and 629 mutTSHR cells, which was confirmed by Western blot analysis (Table 1; Fig. 6). In view of the role of mTOR as a downstream target of PI3K we asked if there is an altered signaling via the PI3K/Akt axis in the mutTSHR compared to the WT TSHR cells. Positive crosstalks between the TSH/cAMP pathway with ERK and PI3K signal cascades have been suggested to mediate cAMP induced cell proliferation in FRTL-5 and WRT cells (Roger et al., 2010). Akt is a serine/threonine-specific protein kinase that mediates a number of the effects of PI3K. To elucidate the effects of cAMP on Akt activity in

the constitutively active TSHR mutants and the WT, Akt phosphorylation was determined after stimulation of the adenylate cyclase with 10 μ M forskolin for 5 min. In 623 mutTSHR cells induction of the adenylate cyclase increased the phosphorylation of Akt (S473) 1.5-fold (± 0.75) in contrast to WT, 629 and Del TSHR cells, in which Akt phosphorylation significantly decreased (Fig. 7A). Conversely, inhibition of the PKA by H89 led to diminished Akt phosphorylation in the WT cells but not in the mutTSHR cells, in which Akt phosphorylation significantly increased after PKA inhibition ($p < 0.001$

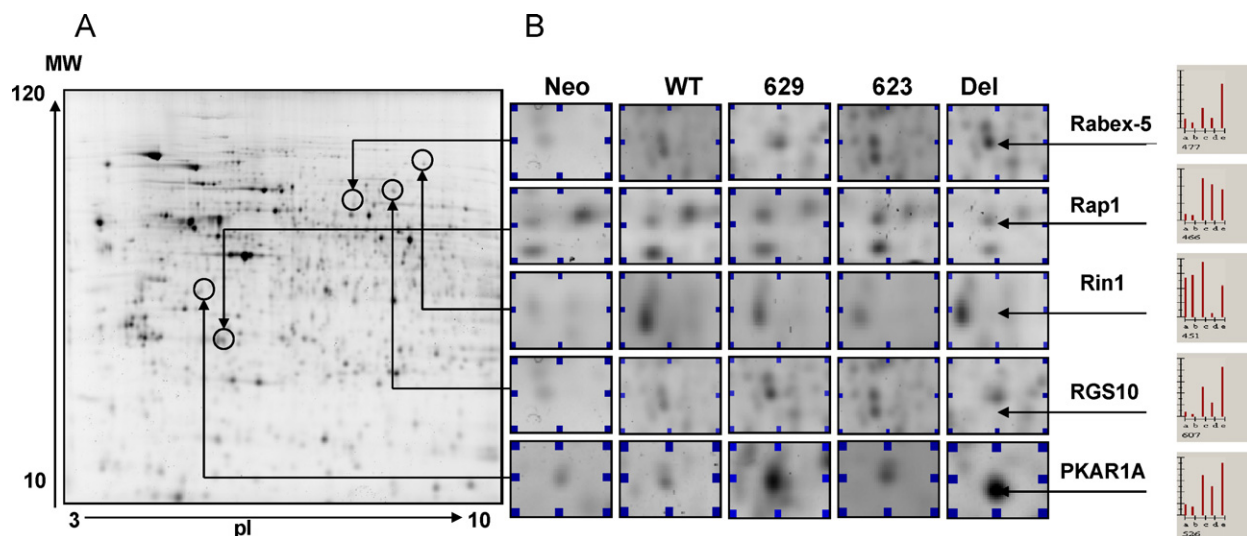


Fig. 4. Differential 2D-gel electrophoresis. (A) The master gel represents an overlay of 50 μ g protein sample, each labelled with cy3, cy5 and a pooled reference (labelled with cy2). (B) Details as enlarged gel image regions of differentially expressed proteins from triplicate experiments. Histograms represent expression levels of spot volumes relative to spot volumes of the internal standard, given as means \pm SEM of three replicates.

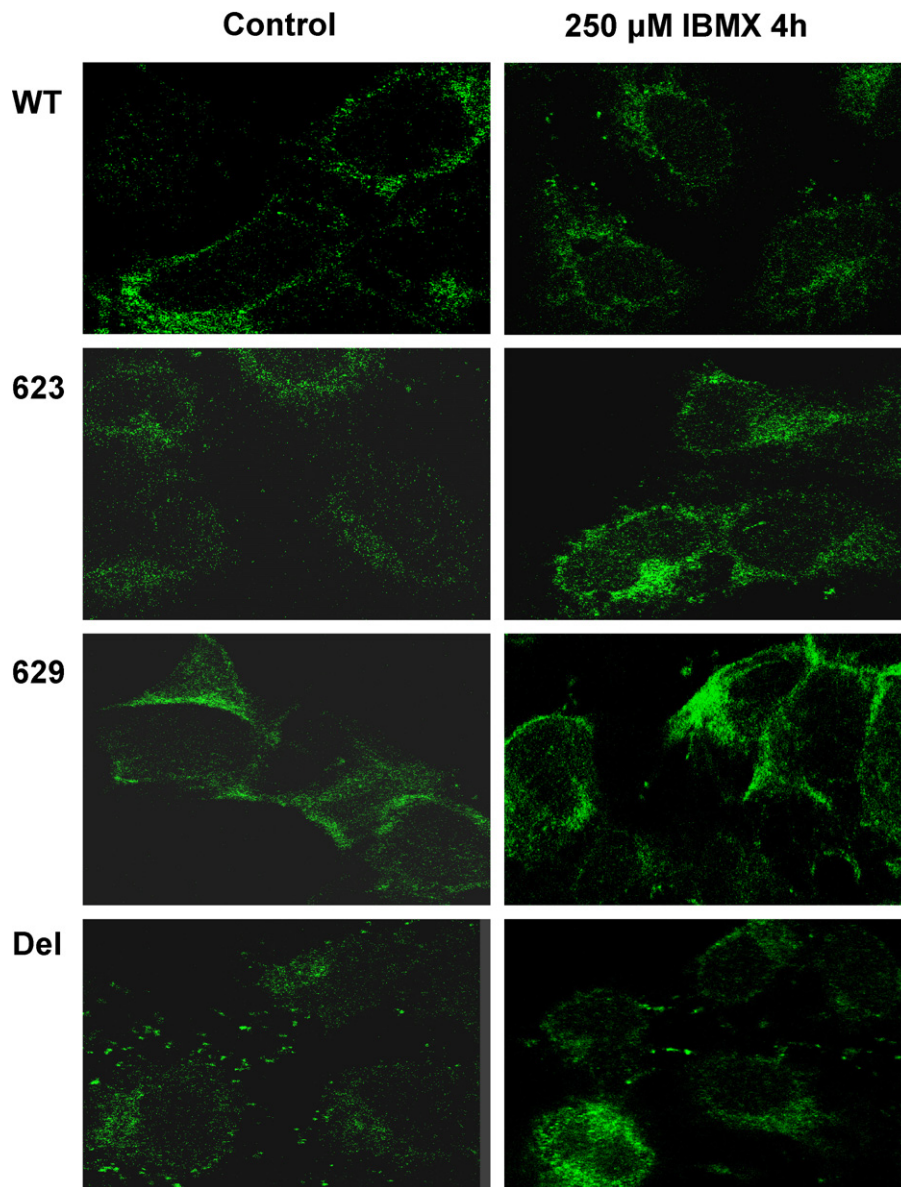


Fig. 5. Distribution of TSHR after IBMX stimulation. mutTSHR cells and WT-TSHR cells were starved for 48 h in 5H medium containing 0.2% serum without TSH. Cells were then stimulated with 250 μ M IBMX for 4 h. The distribution of the receptor was assessed by CLSM as described in materials and methods using a TSHR antibody and an Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody. mutTSHR cells display a shift from a patchy staining in control cells to a diffuse intracellular TSHR staining after treatment with IBMX. In contrast, the WT-TSHR shows no significant change in cellular localization after 4 h IBMX treatment.

for 623 and 629; Fig. 6A). These findings suggest, that in the WT-TSHR cells Akt phosphorylation is dependent on PKA in contrast to the constitutive active TSHR mutants in which cAMP mediated Akt activation is independent from PKA.

To elucidate whether the effects of cAMP on Akt were mediated by PI3K, the effects of LY294002 on forskolin mediated Akt S473 phosphorylation was analyzed. First, addition of the PI3K inhibitor LY294002 at concentrations of 10 μ M to forskolin stimulated cells inhibited Akt phosphorylation in all cell clones (Fig. 6). Moreover, at the same concentrations of LY294002, cAMP stimulated p70s6k T389 phosphorylation was reduced in the mutTSHR but not in the WT-TSHR cells (Fig. 6). Treatment with the mTOR inhibitor rapamycin did not abolish forskolin induced p70s6k phosphorylation in the WT-TSHR, 623 and 629 mutTSHR cells, indicating that activation of p70s6k in these cells is not mTOR dependent (Fig. 7B). However, it cannot be excluded that the inhibition of p70s6k phosphorylation requires concentrations of rapamycin higher than 10 μ M. In contrast, rapamycin failed to inhibit Akt phosphorylation,

which indicates that cAMP effects on Akt activation are not mediated by an mTOR induced feedback-loop (data not shown).

The contribution of an Epac/Rap1 signal loop in the mitogenic actions of cAMP has been found in rat PCC13 cells, where cAMP via an Epac/Protein Phosphatase 2 complex inhibits Akt activity mediated by PKA and Rap-GTP (Hong et al., 2008a). In view of the high expression of Rap1 in the WT-TSHR but not in the mutTSHR cells, we next analyzed if the Epac/Rap1 pathway alternatively contributes to cAMP induced Akt activation. Stimulation with the Epac selective cAMP analogue 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-pCPT) significantly inhibited Akt S473 phosphorylation in all cell clones. Inhibition of mTOR with rapamycin stimulated the Akt phosphorylation in Del mutTSHR cells (Fig. 7C).

3.4.3. Differential activation of the MAPK pathway

We next aimed to analyze the activation of the MAPK cascade across the mutTSHR and the WT-TSHR cells. The cells were stimulated with 10 μ M forskolin for 5 min with or without prior

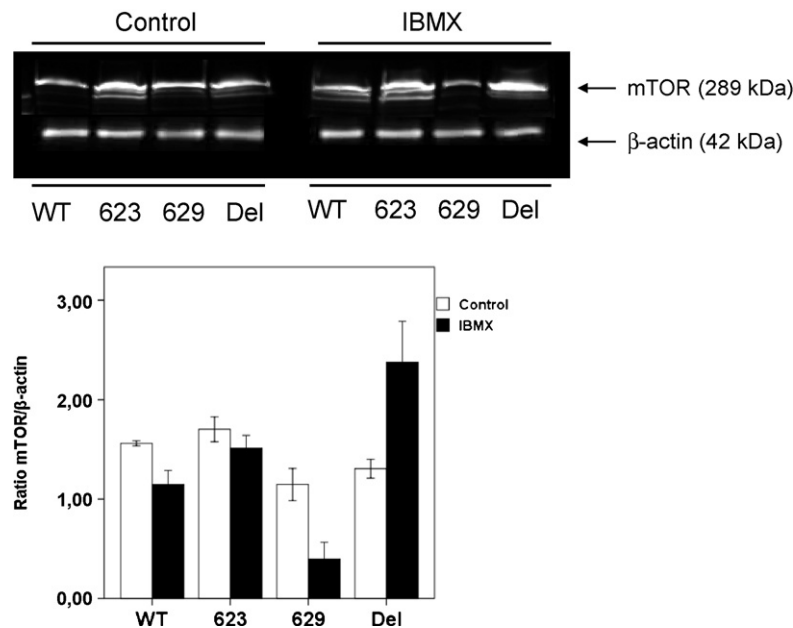


Fig. 6. Western blots confirming the increased expression of mTOR in A623I and Del613–621 FRTL-5 cells. Cells were treated with 250 μ M IBMX for 4 h followed by Western blot analysis using a rabbit monoclonal antibody against mTOR. Panel graphs correspond to the quantification of protein expression by Western blot. Western blot densitometry analyses for protein quantification were performed with Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). The data are presented as means \pm SEM of the ratios of mTOR expression normalized to β -actin expression of $n = 3$ Western blots.

inhibition of the PKA by H89. As shown in Fig. 7, the pattern of ERK stimulations is similar between WT-TSHR and the 629 mutant, in which forskolin elicits an increase in p42/44 phosphorylation, which is even amplified by inhibition of the PKA. Conversely, in the 623 and Del mutTSHR cells, the basal level of p42/p44 phosphorylation is higher compared to WT and 623 cells. The addition of forskolin to 629 and Del mutTSHR cells led to a decline in p42/44 phosphorylation which is restored to basal levels by inhibition of the PKA (Fig. 8).

3.5. Differential expression of thyroid-specific proteins and proteins involved in gene transcription

The thyroid peroxidase, which is essential for thyroid hormone synthesis was upregulated in the mutTSHR compared to the WT-TSHR cells (629 > Del > 623 > WT). In addition, we identified several transcription factors as differentially expressed. Krueppel-like factor 6, transcription factor Sp8 and transcription termination factor 1 (TTF-1) were significantly overexpressed in the TSHR mutants compared to the WT TSHR cells (Table 1). In contrast, the GC-rich sequence DNA-binding factor was significantly increased in WT TSHR cells compared to Del (2.3-fold), 623 (2.2-fold) and to the 629 mutTSHR cells (1.6-fold; Table 1). (Fig. 9)

4. Discussion

Cyclic AMP controls both thyroid growth and function, which is further exemplified by a phenotype of toxic thyroid hyperplasia in transgenic mice with chronic cAMP stimulation in the thyroid as well as hyperthyroidism and goiter in individuals with germline gain-of-function TSHR mutations (Vassart and Dumont, 1992; Paschke and Ludgate, 1997; Corvilain et al., 2001). Activating TSHR mutations result in TSH-independent growth. In vitro, the TSHR mutants differ in their degree of constitutive activation of the cAMP and inositol phosphate cascades, but this in vitro effect does not correlate with the clinical phenotype of thyroid autonomy in vivo (Fuhrer et al., 2003). The molecular causes are not fully understood yet, but distinct activation of cAMP and IP downstream

signaling cascades, the loss of negative-feedback-mechanisms or altered expression of phosphatases have been suggested, which collectively might contribute to differences in activation of proliferation and function. Furthermore the unique and exclusive role of cAMP-PKA for growth induction in thyrocytes is not undisputed (Kimura et al., 2001; Saavedra et al., 2002; Tsygankova et al., 2001). In this study we applied a proteomic approach with the idea of depicting global alterations in protein expressions, which occur due constitutive activation of the TSHR. Thus, we used a well-established in vitro model of FRTL-5 cell clones stably expressing three activating TSHR mutants (A623I, L629F and Del613–621) or the wild-type (WT) TSHR. Altered protein expression profiles of the mutTSHR and the WT-TSHR FRTL-5 cells were found for proteins in particular involved in endocytosis, cell transduction and gene transcription.

First, we identified the increased expression of proteins of the RAB family, which regulate intracellular vesicle targeting. The small GTPases Rab 21, 23, 43 and 3A were collectively overexpressed in the mutTSHR compared to WT cells. Rab21 and Rab23 are involved in the dynamics of the early endosome (Simpson et al., 2004; Evans et al., 2003). Rab 43 is implicated in the retrograde transport, through which membrane-bound vesicles from endosomes are transported to the Golgi apparatus, where the vesicles are recycled (Haas et al., 2007). Furthermore, the functional relevance of small GTPase Rab3A lies in the GTP-dependent exocytosis (Branham et al., 2009). The finding of combined overexpression of several RabGTPases with relevance at different functionally and compositionally specialized subdomains of the endomembrane system equates with the finding of reduced cell surface expression of the mutTSHR in vitro and in vivo in patients with Graves' disease (Fuhrer et al., 2003; Sequeira et al., 2002). Endocytosis has long been considered as a way of terminating signaling processes via receptor degradation. Based on the conventional model of TSHR signaling and trafficking, where the TSH-induced signal is quickly desensitized and the TSHR internalized (Ferguson, 2001), the theory of increased TSHR endocytosis of the constitutively active TSHR mutants would be contradictory to the observed persistent cAMP signaling in the mutants. However, recently it has been shown that

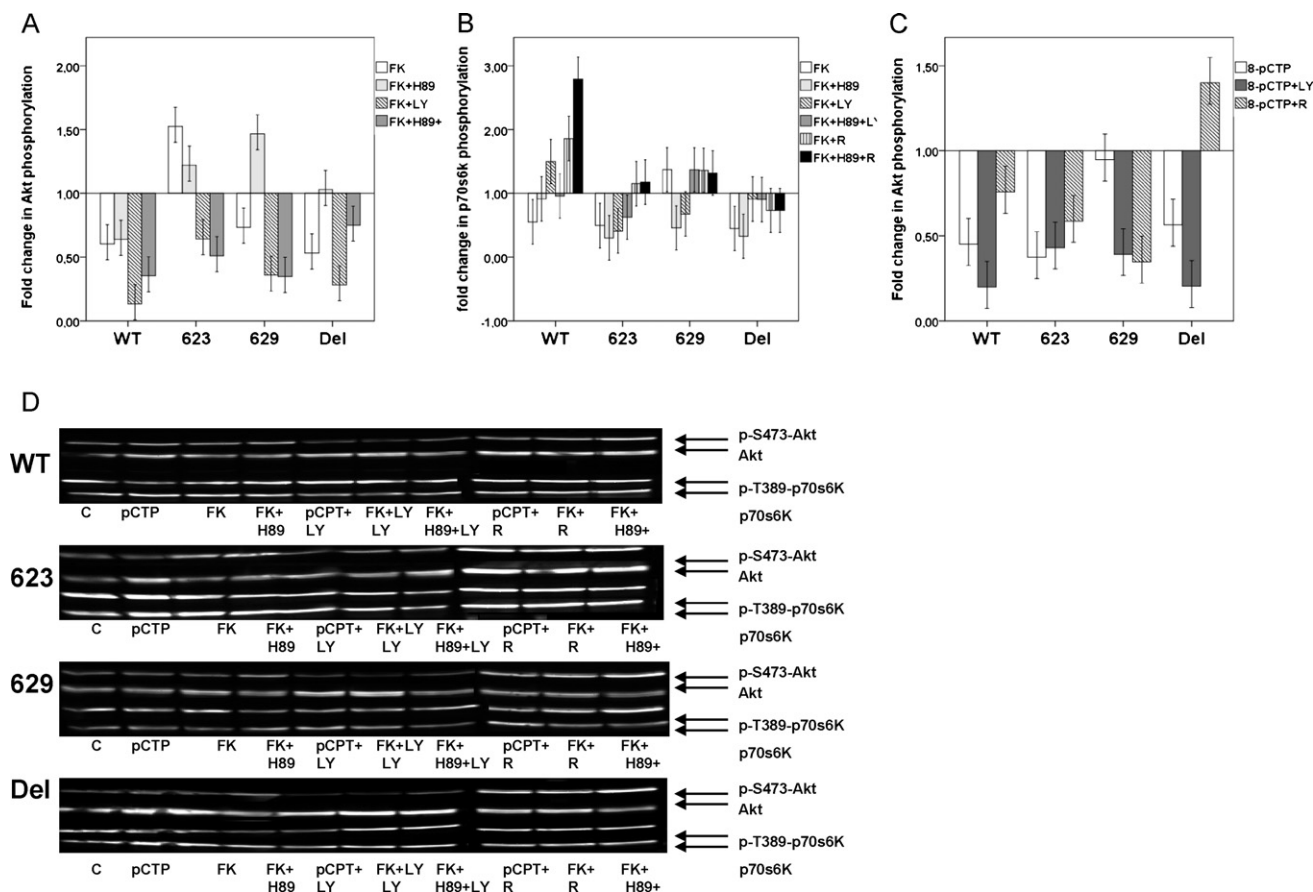


Fig. 7. Influence of cAMP on PI3K/Akt/mTOR pathway. (A) cAMP mediated Akt signaling is dependent on PKA in the WT-TSHR but not in the mutTSHR FRTL-5 cells. In 623 mutTSHR cells induction of the adenylate cyclase increased the phosphorylation of Akt (S473) 1.5-fold (± 0.75 ; $*p < 0.001$). Inhibition of the PKA by H89 led to diminished Akt phosphorylation in the WT cells but not in the mutTSHR cells ($**p < 0.001$ for 623 and 629). Addition of the PI3K inhibitor LY294002 to forskolin stimulated cells inhibited Akt phosphorylation in all cell clones. Cell clones were treated with 10 μ M forskolin (FK) for 5 min in the absence or in the presence of 10 μ M H89 and/or 10 μ M LY294002. H89 and LY294002 were preincubated 60 min before stimulation with forskolin. (B) Effect of rapamycin on cAMP mediated p70s6k signaling. Inhibition of the PI3K by LY294002 lead to reduction of cAMP stimulated p70s6k-T389 phosphorylation in the mutTSHR but not in the WT-TSHR cells. mTOR inhibition by rapamycin did not abolish cAMP stimulated p70s6k phosphorylation in the WT-TSHR cells, 623 and 629 mutTSHR cells. FRTL-5 cell clones were treated with 10 μ M forskolin (FK) for 5 min in the absence or in the presence of 10 μ M H89 and/or 10 μ M rapamycin (R). Inhibitors were preincubated 60 min before stimulation with forskolin. (C) The effect of Epac stimulation on Akt activation. Stimulation with the Epac selective cAMP analogue 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-pCPT) significantly inhibited Akt S473 phosphorylation in all cell clones. Inhibition of mTOR with rapamycin stimulated the Akt phosphorylation in Del mutTSHR cells. The extent of phosphorylation in all experiments was determined by Western blotting. The changes in phosphorylation are expressed as the ratio of phosphorylated/unphosphorylated normalized to unstimulated controls (mean \pm SEM of three experiments). A representative Western blot is shown in (D).

the endosome may serve as signaling platform. In a seminal paper by Calebiro et al. it was shown in an in vitro model of primary thyroid follicles from a transgenic mouse with a cAMP-GFP reporter, that the internalized TSHR signals persistently to the adenylate cyclase (Calebiro et al., 2009). In the meantime, this model was also confirmed by others (Neumann et al., 2010; Ferrandon et al., 2009). Therefore, upregulation of Rab proteins suggesting increased endocytosis in the mutTSHR FRTL-5 cells, adds to a new concept of constitutive cAMP signaling in thyroid autonomy.

Second, we found an altered expression of Rin1 and Rab5 GDP/GTP exchange factor 5 (Rabex-5), which function not only in endocytosis (Chen et al., 2009; Tall et al., 2001) but act as negative regulators of Ras/Raf/MEK signaling (Han and Colicelli, 1995; Tall et al., 2001; Wang et al., 2002). Thus, by its Ras effector binding domain, Rin1 competes with Raf1 for direct binding to GTP-bound Ras thereby inducing a concerted blockade of RAF/ERK signaling (Han and Colicelli, 1995). Furthermore, Rin1 appears to be an essential component of the regulatory cascade that controls Ras ubiquitination, since overexpression of Rin1 leads to ubiquitination of Ras. Rabex-5, which possesses E3 ubiquitin ligase activity, inhibits Ras signaling by Ras ubiquitination, thereby

attenuating RAS/MEK signaling. In *Drosophila* a Rabex-5 loss-of-function mutant had a striking similar phenotype to those caused by gain-of-function mutation in Ras (Yan et al., 2010). In our cell model Rin1 protein expression was significantly downregulated in A623I compared to L629F, Del613-621 mutTSHR and WT-TSHR FRTL-5 cells. Rabex-5 was overexpressed in L629F and Del613-621 mutTSHR cells vs. WT-TSHR FRTL-5 cells. These findings suggest altered Ras signaling induced by Rin1 and Rabex-5 in the L629F and Del613-621 mutTSHR FRTL-5 cells. In thyroid cells it is well known that TSH requires Ras to elicit a proliferative response in the absence of PKA. Short time stimulation with cAMP inhibits the Ras-Raf1 complex formation while stimulating Ras-PI3K formation (Ciullo et al., 2001). Thus, it is tempting to speculate that Ras signaling may be affected in the gain-of-function TSHR cells by alterations in the complex interplay between Rin1 and Rabex-5 in FRTL-5 cells. However, this hypothesis needs further investigation.

Another protein involved in GPCR signaling is the cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit (PRKAR1A). PRKAR1A was overexpressed in the mutTSHR FRTL-5 cells compared to the WT-TSHR cells. Inactivating mutations in the PKAR1A gene have been identified as the molecular cause of the

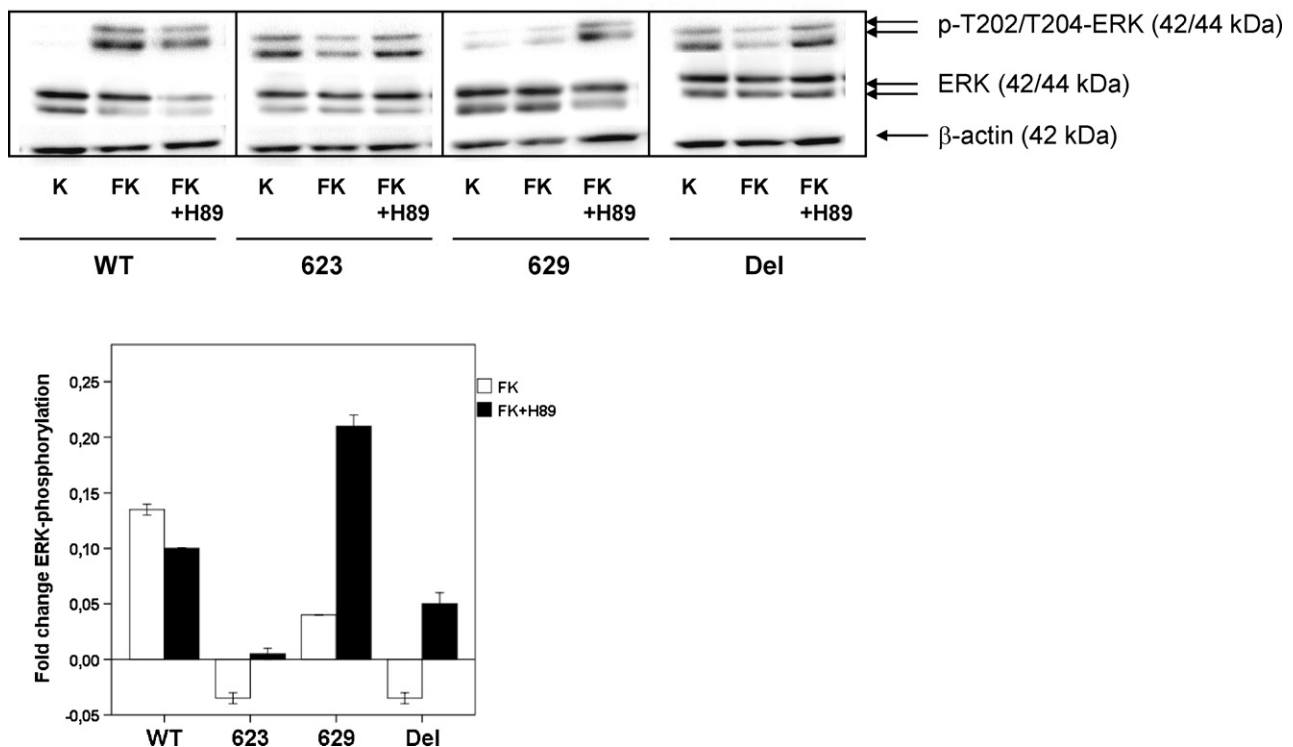


Fig. 8. Differential activation of the MAPK pathway. In the WT-TSHR and the L629F mutTSHR cells, forskolin (FK) elicits an increase in ERK phosphorylation, which is even amplified by inhibition of the PKA. Conversely, in the A623I and Del613–621 mutTSHR cells, the basal level of p42/p44 phosphorylation is higher compared to WT-TSHR and A623I cells. The addition of forskolin to L629F and Del613–621 mutTSHR FRTL-5 cells led to a decline in ERK phosphorylation which is restored to basal levels by inhibition of the PKA. FRTL-5 cells were treated with 10 μ M forskolin (FK) for 5 min in the absence or in the presence of 10 μ M H89. Inhibitors were added to the medium 60 min before stimulation with forskolin. The extent of phosphorylation of ERK was determined by Western blotting using antibodies against the T202/T204-epitopes. The changes in phosphorylation are expressed as the ratio of phosphorylated/unphosphorylated protein as the mean \pm SEM of three experiments.

Carney complex, a multiple neoplasia syndrome (Bertherat et al., 2003). In thyrocytes, the role of individual PKA subunits is controversial. Observations in FRTL-5 cells suggest that the PKA II rather than PKA I mediates the proliferative effect of TSH in FRTL-5 cells. Interestingly, the same workgroup reported that PKA I selective analogues induced iodine uptake, suggesting that PKA I may be relevant for activation of function (Calebiro et al., 2006). In contrast, in dog thyrocytes it was shown that both PKA isoforms mediate TSH effects on cell function (e.g. iodide uptake and thyroid hormone production), while the PKA I was reported to be especially relevant for cell proliferation and DNA synthesis (Van Sande et al., 1989). This finding was confirmed in our previous study, where the DNA synthesis in presence of IBMX was markedly increased in the mutTSHR compared to the WT-TSHR FRTL-5 cells (Führer et al., 2003).

Another finding of the proteome expression analysis was the observation of Rap1 upregulation in the constitutive active TSHR mutants compared to the WT. Rap1 activation is mediated by guanine nucleotide exchange factors (GEFs) that substitute the bound GDP for GTP. Epac1 and 2 are GEFs directly regulated by cAMP through binding of cAMP to a cAMP-binding domain very similar to those present in the regulatory domain of protein kinase A (PKA) (de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998b). The most recently identified GEF for Rap1 is RapGEF2 (PDZ-GEF1) (Kuiperij et al., 2003). Similar to Epac, RapGEFs are directly activated by cAMP and mediate the GTP exchange on Rap1. This effect is PKA independent. In our study Rap1 and RapGEF2 were both upregulated in A623I and L629F mutTSHR FRTL-5 cells, providing evidence for an increased Rap1-signaling in these constitutively active TSHR mutants. Akt is a likely downstream effector of cAMP-Rap1 action. In WRT thyrocytes, TSH activates Rap1, which induces Akt phosphorylation

(Tsygankova et al., 2001). In PCC13 cells, cAMP inhibits Akt via activated and phosphorylated Rap1b (Hong et al., 2008b). Epac proteins play a role in the PKA independent effects by activation of Rap1 (Kawasaki et al., 1998a; de Rooij et al., 1998). In our cell system we found significant differences in PI3K/Akt signaling between FRTL-5 cells expressing the mutTSHR or the WT-TSHR: 1. Akt phosphorylation is dependent on PKA in the WT-TSHR but not in the mutTSHR FRTL-5 cells (Fig. 7A). 2. Rap1 protein expression is increased in A623I and L629F mutTSHR cells. 3. Activation of Epac impairs short-time Akt phosphorylation in both, mutTSHR and WT-TSHR FRTL-5 cells. 4. S6K1 phosphorylation is dependent on PI3K in mutTSHR but not in WT-TSHR FRTL-5 cells, which suggests a crosstalk between PKA and an upstream kinase of PI3K, i.e. PDK-1.

In thyrocytes, depending on the cellular system, Akt either stimulates or inhibits TSH mediated cell proliferation (Tsygankova et al., 2001; De Gregorio et al., 2007; Saito et al., 2001). Furthermore, the inhibitory effect of cAMP on Akt phosphorylation is transient (half-maximal effects developed within 2 min) (Lou et al., 2002). This finding might explain the inhibition of Akt activity 5 min after stimulation with the Epac-selective agent 8-pCTP in the mutTSHR and the WT-TSHR FRTL-5 cells. Collectively, these findings suggest that the constitutive activation of cAMP signaling in the mutTSHR cells leads to increased PI3K/Akt signaling predominantly mediated by Rap1, in contrast to cAMP-PKA signaling in the WT-TSHR FRTL-5 cells.

In summary, our findings underline the complexity of gain-of-function TSHR signaling in thyrocytes, which extends far beyond pure cAMP and/or IP formation. Further studies are required to clarify whether the observed differences in Rab, PI3K and Epac signaling contribute to differences in the phenotypic presentation, i.e. stimulation of function and growth of thyroid autonomy in vivo.

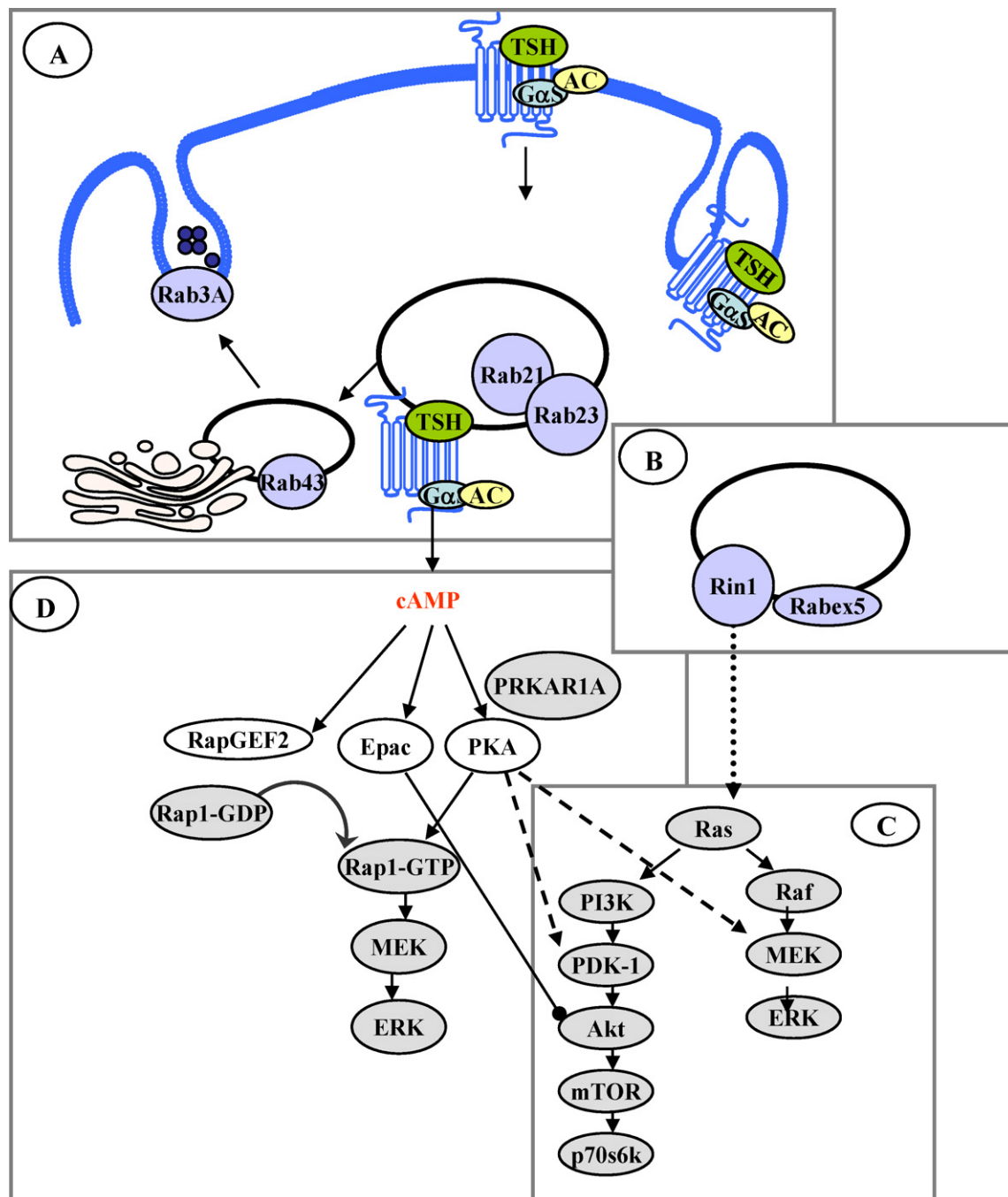


Fig. 9. Schematic summary illustrating the functional protein complexes which were found to be altered due to constitutive activation of the TSHR. (A) The finding of the increased expression of Rab proteins point to an augmented TSHR internalization in mutTSHR but not in the WT-TSHR cells. (B) Rin1 was found to be significantly overexpressed in the WT-TSHR, L629F and Del613-621 mutTSHR but not in A623I mutTSHR cells. Besides its function in endocytosis, it has recently been shown that Rin1 in cooperation with Rabex-5 impairs Ras/Raf/MEK signaling. (C) The role of the Rin1/Rabex-5 complex in our FRTL-5 cells has not yet been investigated and the suggested Ras/PI3K crosstalk due to the inhibitory effect of Rin1 on the Ras/Raf formation in the rat thyroid cell system requires further experimental confirmation. Furthermore, we found several lines of evidence for altered PI3K/Akt signaling in mutTSHR vs. WT-TSHR cells: 1. mTOR is overexpressed in A623I and Del613-621 cells, 2. Akt phosphorylation (S473) is dependent on PKA in the WT-TSHR but not in the mutTSHR cells. 3. Phosphorylation of p70S6K1 is dependent on PI3K in mutTSHR but not in WT-TSHR cells, which suggests a crosstalk between PKA and an upstream kinase of PI3K, i.e. PDK-1.4. Activation of Epac impairs short-time Akt phosphorylation in both, mutTSHR and WT-TSHR cells. (D) Protein expression of Rap1 was higher in mutTSHR vs. WT-TSHR FRTL-5 cells. RPGF2 was increased in WT-TSHR and Del613-621 cells. Similar to RPGF2 Epac is involved in Rap1 activation. Although an interaction between Epac and Rap1 in this cell model has not been investigated, we could show that activation of Epac in all TSHR FRTL-5 cell clones (WT and mutTSHR cells) impairs Akt activation.

Acknowledgements

We thank Beate Jeßnitzner and Monika Gutknecht for excellent technical help. This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Fu 356/3-1) and a grant from the Interdisciplinary Center for Clinical Research Leipzig (Project B26).

References

- Bertherat J, Groussin L, Sandrini F, Matyakhina L, Bei T, Stergiopoulos S, et al. Molecular and functional analysis of PRKAR1A and its locus (17q22-24) in sporadic adrenocortical tumors: 17q losses, somatic mutations, and protein kinase A expression and activity. *Cancer Res* 2003;63:5308–19. Available from PM: 14500362.

- Branham MT, Bustos MA, De Blas GA, Rehmann H, Zarelli VEP, Trevio CL, et al. Epac activates the small G Proteins Rap1 and Rab3A to achieve exocytosis. *J Biol Chem* 2009;284:24825–39, Available from <http://www.jbc.org/content/284/37/24825.abstract>.
- Calebiro D, de Filippis T, Lucchi S, Martinez F, Porazzi P, Trivellato R, et al. Selective modulation of protein kinase A I and II reveals distinct roles in thyroid cell gene expression and growth. *Mol Endocrinol* 2006;20:3196–211, Available from PM: 16887886.
- Calebiro D, Nikolaev VO, Gagliani MC, de Filippis T, Dees C, Tacchetti C, et al. Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biol* 2009;7:e1000172, Available from PM: 19688034.
- Chen PI, Kong C, Su X, Stahl PD. Rab5 isoforms differentially regulate the trafficking and degradation of epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem* 2009;284:30328–38, Available from PM: 19723633.
- Ciullo I, Diez-Roux G, Di Domenico M, Migliaccio A, Avvedimento EV. cAMP signaling selectively influences Ras effectors pathways. *Oncogene* 2001;20:1186–92, Available from PM: 11313862.
- Corvilain B, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G. Somatic and germline mutations of the TSH receptor and thyroid diseases. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001;55:143–58, Available from PM: 11531919.
- Danos O, Mulligan RC. Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:6460–4, Available from PM: 3413107.
- De Gregorio G, Coppa A, Cosentino C, Ucci S, Messina S, Nicolussi A, et al. The p85 regulatory subunit of PI3K mediates TSH-cAMP-PKA growth and survival signals. *Oncogene* 2007;26:2039–47, Available from PM: 17043656.
- de Rooij J, Zwartkruis FJT, Verheijen MHG, Cool RH, Nijman SMB, Wittinghofer A, et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 1998;396:474–7, Available from <http://dx.doi.org/10.1038/24884>.
- Evans TM, Ferguson C, Wainwright BJ, Parton RG, Wicking C. Rab23, a negative regulator of hedgehog signaling, localizes to the plasma membrane and the endocytic pathway. *Traffic* 2003;4:869–84, Available from PM: 14617350.
- Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 2001;53:1–24, Available from <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/53/1/1.abstract>.
- Ferrandon S, Feinstein TN, Castro M, Wang B, Bouley R, Potts JT, et al. Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat Chem Biol* 2009;5:734–42, Available from PM: 19701185.
- Fuhrer D, Lewis MD, Alkhafaji F, Starke K, Paschke R, Wynford-Thomas D, et al. Biological activity of activating thyroid-stimulating hormone receptor mutants depends on the cellular context. *Endocrinology* 2003;144:4018–30, Available from PM: 12933676.
- Haas AK, Yoshimura SI, Stephens DJ, Preisinger C, Fuchs E, Barr FA. Analysis of GTPase-activating proteins: Rab1 and Rab43 are key Rabs required to maintain a functional Golgi complex in human cells. *J Cell Sci* 2007;120:2997–3010, Available from <http://jcs.biologists.org/cgi/content/abstract/120/17/2997>.
- Han L, Colicelli J. A human protein selected for interference with Ras function interacts directly with Ras and competes with Raf1. *Mol Cell Biol* 1995;15:1318–23, Available from <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/15/3/1318>.
- Hong K, Lou L, Gupta S, Ribeiro-Neto F, Altschuler DL. A novel Epac-Rap-PP2A signaling module controls cAMP-dependent Akt regulation. *J Biol Chem* 2008a;283:23129–38, Available from PM: 18550542.
- Hong K, Lou L, Gupta S, Ribeiro-Neto F, Altschuler DL. A novel Epac-Rap-PP2A signaling module controls cAMP-dependent Akt regulation. *J Biol Chem* 2008b;283:23129–38, Available from <http://www.jbc.org/content/283/34/23129.abstract>.
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, et al. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 1998a;282:2275–9, Available from PM: 9856955.
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, et al. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 1998b;282:2275–9, Available from <http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/282/5397/2275>.
- Kimura T, Van Keymeulen A, Golstein J, Fusco A, Dumont JE, Roger PP. Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr Rev* 2001;22:631–56, Available from <http://edrv.endojournals.org/cgi/content/abstract/22/5/631>.
- Krause K, Schierhorn A, Sinz A, Wissmann JD, Beck-Sickinger AG, Paschke R, et al. Towards the application of proteomics to human thyroid tissue. *Dtsch Med Wochenschr* 2006;131:1131–43, Available from PM: 17123340.
- Kuiperij HB, de Rooij J, Rehmann H, van Triest M, Wittinghofer A, Bos JL, et al. Characterisation of PDZ-GEFs, a family of guanine nucleotide exchange factors specific for Rap1 and Rap2. *Biochim Biophys Acta (BBA) Mol Cell Res* 2003;1593:141–9, Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T20-47423F2-1/2/59365db0beb1b1db64a68f54c2264231>.
- Laugwitz KL, Allgeier A, Offermanns S, Spicher K, Van Sande J, Dumont JE, et al. The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:116–20, Available from <http://www.pnas.org/content/93/1/116.abstract>.
- Lorenz S, Eszlinger M, Paschke R, Aust G, Weick M, Fuhrer D, et al. Calcium signaling of thyrocytes is modulated by TSH through calcium binding protein expression. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803:352–60, Available from PM: 20083144.
- Lou L, Urbani J, Ribeiro-Neto F, Altschuler DL. cAMP inhibition of Akt is mediated by activated and phosphorylated Rap1b. *J Biol Chem* 2002;277:32799–806, Available from <http://www.jbc.org/content/277/36/32799.abstract>.
- Medina DL, Santisteban P. Thyrotropin-dependent proliferation of in vitro rat thyroid cell systems. *Exp Cell Res* 2000;143:161–78, Available from PM: 10913934.
- Morshed SA, Latif R, Davies TF. Characterization of thyrotropin receptor antibody-induced signaling cascades. *Endocrinology* 2009;150:519–29, Available from PM: 18719020.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 1988;9:255–62, Available from PM: 2466658.
- Neumann S, Geras-Raaka E, Marcus-Samuels B, Gershengorn MC. Persistent cAMP signaling by thyrotropin (TSH) receptors is not dependent on internalization. *FASEB J* 2010, Available from PM: 20538910.
- Pak Y, Pham N, Rotin D. Direct binding of the {beta}1 adrenergic receptor to the cyclic AMP-dependent guanine nucleotide exchange factor Cnras-GEF leads to Ras activation. *Mol Cell Biol* 2002;22:7942–52, Available from <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/22/22/7942>.
- Paschke R, Ludgate M. The thyrotropin receptor in thyroid diseases. *N Engl J Med* 1997;337:1675–81, Available from PM: 9385128.
- Pham N, Cheglakov I, Koch CA, de Hoog CL, Moran MF, Rotin D. The guanine nucleotide exchange factor CnrasGEF activates ras in response to cAMP and cGMP. *Curr Biol* 2000;10:555–8, Available from PM: 10801446.
- Roger PP, van Staveren WC, Coulonval K, Dumont JE, Maenhaut C. Signal transduction in the human thyrocyte and its perversion in thyroid tumors. *Mol Cell Endocrinol* 2010;321:3–19, Available from PM: 19962425.
- Saavedra AP, Tsygankova OM, Prendergast GV, Dworet JH, Cheng G, Meinkoth JL. Role of cAMP, PKA and Rap1A in thyroid follicular cell survival. *Oncogene* 2002;21:778–88, Available from PM: 11850806.
- Saito J, Kohn AD, Roth RA, Noguchi Y, Tatsumo I, Hirai A, et al. Regulation of FRTL-5 thyroid cell growth by phosphatidylinositol (OH) 3 kinase-dependent Akt-mediated signaling. *Dtsch Med Wochenschr* 2001;11:339–51, Available from PM: 11349832.
- Sequeira M, Jasani B, Fuhrer D, Wheeler M, Ludgate M. Demonstration of reduced in vivo surface expression of activating mutant thyrotropin receptors in thyroid sections. *Exp Cell Res* 2002;146:163–71, Available from PM: 11834424.
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 2006;1:2856–60, Available from PM: 17406544.
- Simpson JC, Griffiths G, Wessling-Resnick M, Fransen JAM, Bennett H, Jones AT. A role for the small GTPase Rab21 in the early endocytic pathway. *J Cell Sci* 2004;117:6297–311, Available from <http://jcs.biologists.org/cgi/content/abstract/117/26/6297>.
- Tall GG, Barbieri MA, Stahl PD, Horazdovsky BF. Ras-activated endocytosis is mediated by the Rab5 guanine nucleotide exchange activity of RIN1. *Dev Cell* 2001;1:73–82, Available from PM: 11703925.
- Tsygankova OM, Saavedra A, Rebhun JF, Quilliam LA, Meinkoth JL. Coordinated regulation of Rap1 and thyroid differentiation by cyclic AMP and protein kinase A. *Mol Cell Biol* 2001;21:1921–9, Available from <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/21/6/1921>.
- Van Sande J, Lefort A, Beebe S, Roger P, Perret J, Corbin J, et al. Pairs of cyclic AMP analogs, that are specifically synergistic for type I and type II cAMP-dependent protein kinases, mimic thyrotropin effects on the function, differentiation expression and mitogenesis of dog thyroid cells. *Eur J Biochem* 1989;183:699–708, Available from PM: 2550222.
- Vassart G, Dumont JE. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev* 1992;13:596–611, Available from <http://edrv.endojournals.org/cgi/content/abstract/13/3/596>.
- Wang Y, Waldron RT, Dhaka A, Patel A, Riley MM, Rozenberg E, et al. The RAS effector RIN1 directly competes with RAF and is regulated by 14-3-3 proteins. *Mol Cell Biol* 2002;22:916–26, Available from PM: 11784866.
- Wonerow P, Chey S, Fuhrer D, Holzapfel HP, Paschke R. Functional characterization of five constitutively activating thyrotropin receptor mutations. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000;53:461–8, Available from PM: 11012571.
- Yan H, Jahanshahi M, Horvath EA, Liu HY, Pfleger CM. Rabex-5 ubiquitin ligase activity restricts Ras signaling to establish pathway homeostasis in *Drosophila*. *Curr Biol* 2010;20:1378–82, Available from PM: 20655224.

6. Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Titel: **Unterschiede in der Signaltransduktion bei mutierten konstitutiv-aktiven TSH-Rezeptoren**

Eingereicht von: Alexandra Stephan, geb. Boisdard

Angefertigt an der: Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Klinik und Poliklinik für Endokrinologie und Nephrologie

Betreut von: Prof. Dr. Dr. med. Dagmar Führer
PD. Dr. rer. nat. Knut Krohn

Eingereicht im: Februar 2016

Die Schilddrüsen (SD) - Autonomie ist eine häufige endokrinologische Erkrankung, die durch die Entstehung von autonomem SD-Gewebe und normabweichende SD-Hormonwerte gekennzeichnet ist. Das autonome Gewebe entzieht sich dem hypophysären Regelkreis und kann sich in Form von heißen Knoten darstellen. Die Mehrheit der Autonomien wird durch aktivierende Mutationen des *Thyreoida-stimulierenden Hormon (TSH)*-Rezeptor-Gens erklärt. Mutationen des TSH-Rezeptors (TSHR) kommen vorwiegend in Jodmangelgebieten vor. Es wird vermutet, dass der Jodmangel, zusammen mit anderen Faktoren, eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Mutationen spielt.

Der TSHR ist ein heptahelikaler Rezeptor, der zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gehört. Bei den Mitgliedern dieser Familie bewirkt die Anwesenheit des

Liganden, in diesem Fall TSH, eine Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch eine Aktivierung von G-Proteinen erfolgt. Durch Mutationen erreichen die TSHR einen dauerhaft aktivierten Zustand, d. h. es handelt sich um konstitutiv-aktivierende Mutationen.

Die Signaltransduktion des TSHRs erfolgt über Gs- und Gq-Proteine sowie zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) bzw. Inositoltrisphosphat (IP3) als Second-Messenger. Man nimmt jedoch an, dass bei mutierten TSHR (mTSHR) weitere Signalwege stimuliert werden (Führer, 1997).

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression von Signalproteinen in SD-Zellen, die mTSHR bzw. Wildtyp (WT)-TSHR exprimieren, zu untersuchen und zu vergleichen, um Unterschiede in der mutationsabhängigen Signaltransduktion zu entschlüsseln.

Drei FRTL-5 Zelllinien mit stabiler mTSHR-Expression an der zellulären Oberfläche wurden in der Arbeit näher untersucht: Del 613-621(Del), A623I (623) und L629F (629). Es erfolgte eine experimentelle Untersuchung der Proteine durch die 2D-Gelelektrophorese Methode, die einen Vergleich zwischen verschiedenen Proteinmustern erlaubt. Die Untersuchungsergebnisse wurden anschließend mittels Massenspektroskopie, konfokaler Mikroskopie und Western Blot-Untersuchungen validiert.

In der 2D-Gelelektrophorese zeigten sich Unterschiede in der Expression von verschiedenen Proteinen, die mit zellulären Prozessen wie Vesikeltransport, Apoptose, Zelladhäsion, Zellwachstum und Zellproliferation in Verbindung gebracht werden. Interessanterweise wiesen alle untersuchten Mutationen Unterschiede in Bezug auf Vesikeltransport und Endozytosemechanismen auf. So zeigten alle mTSHR eine verstärkte Expression der Proteine Rab21, Rab3A, Rab43 und Rab23, welche die Bildung, Bewegung und Membranfusion von Vesikeln innerhalb der Zelle regulieren.

Eine verstärkte TSHR Internalisierung aller mutierten Rezeptoren im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor konnte ebenfalls mittels konfokaler Mikroskopie nach Stimulation bestätigt werden. Ferner wurde der Frage nachgegangen, welche Signifikanz die gesteigerte Endozytose des TSHRs aufweist. Die mTSHR werden in geringeren Konzentrationen an der Zelloberfläche exprimiert als nicht mutierte, dafür werden sie vermehrt innerhalb der Zelle identifiziert. Da es bekannt ist, dass der Rezeptor auch nach Internalisierung aktiv bleibt, stellte sich die Frage, welche intrazellulären Signalkaskaden in der weiteren Signaltransduktion eine Rolle spielen.

Es wurde zunächst der Phosphoinositol-3-Phosphat (PI3K)-Weg mit den Effektorproteinen Akt,

mTOR und p70s6k untersucht. Es zeigte sich eine verstärkte Expression von mTOR nach TSH-Stimulation der Zelllinien mit der TSHR Mutation Del 613-621 und eine verringerte Expression in den Zelllinien mit der TSHR Mutation L629F. Der mTSHR mit der TSHR Mutation A623I verhielt sich entsprechend dem Wildtyp-Rezeptor.

Um die unterschiedlichen Effekte der konstitutiv-aktivierenden Mutationen auf den PI3K-Signalweg besser zu verstehen, wurde das Zusammenspiel zwischen cAMP-Proteinkinase A (PKA)-Signalweg und PI3K-Akt-Signalweg näher untersucht. In den Zelllinien mit der TSHR Mutation A623I zeigte sich eine verstärkte Phosphorylierung von Akt nach Stimulation des cAMP-Signalwegs, wohingegen die Akt Phosphorylierung in den Zelllinien mit den TSHR Mutationen L629F und Del 613-621 genauso wie beim WT-TSHR verringert war. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Akt in den mTSHR-SD-Zellen unabhängig von der vorgeschalteten PKA war. Somit zeigte die pharmakologische Hemmung der PKA eine Reduktion der Akt-Phosphorylierung in den Zelllinien die WT-TSHR exprimierten, nicht aber in den Zelllinien mit den TSHR Mutationen A623I, L629F und Del 613-621, bei welchen eine Steigerung der Aktivierung zu verzeichnen war.

Im Gegensatz dazu konnte in allen Rezeptortypen die Akt Phosphorylierung durch den PI3K-Inhibitor LY294002 gehemmt werden, was die übergeordnete Bedeutung der PI3K in der Signalisierung widerspiegelt. Die Aktivierung des mTOR-Effektors p70s6k wird hingegen nur in den Zelllinien, die mTSHR exprimieren, durch LY294002 gehemmt, nicht in denen mit Expression von WT, in welchen diese Aktivierung weiterhin PI3K-unabhängig stattfindet. Zum Ausschluss, dass die Akt-Phosphorylierung mTOR-abhängig ist, wurde diese nach Ko-Stimulation mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin gemessen. Durch die unveränderte Akt Phosphorylierung in allen Zelllinien, die mTSHR exprimieren, konnte allerdings eine mögliche Interaktion von mTOR und Akt über ein negatives Feedback ausgeschlossen werden.

Weiterhin war die Expression von Interaktionspartnern der Rab-Proteinfamilie, wie Rin1 und Rabex-5, alteriert. Rin zeigte eine verminderte Expression in den Zelllinien mit der TSHR Mutation A623I im Vergleich zu den Zelllinien mit der Del Mutation und WT, Rabex-5 war in den SD-Zellen mit den TSHR Mutationen L629F und Del 613-621 im Vergleich zu SD-Zellen mit WT vermehrt exprimiert. Bei beiden Proteinen wurden bereits Interaktionen mit dem Ras-MAPK-Signalweg nachgewiesen. Um nach weiteren Effekten der veränderten Rin/Rabex-Expression zu suchen, wurde die Aktivierung des Effektorproteins MAPK innerhalb der mutierten Zelllinien untersucht. In den FRTL-5 Zellen, welche die L629F TSHR Mutation

exprimieren, wurde eine vermehrte MAPK Phosphorylierung nach Stimulation des cAMP-Signalwegs nachgewiesen, ähnlich wie bei SD-Zellen mit WT. Bei SD-Zellen mit den TSHR Mutationen A623I und Del 613-621 wird hingegen eine Abnahme der Phosphorylierung nach Stimulation erreicht. In allen Zelllinien die TSHR Mutationen exprimieren steigt die MAPK-Aktivierung nach pharmakologischer Hemmung der PKA durch H89, was auf eine PKA-unabhängige MAPK-Aktivierung hindeutet.

Ein weiterer Signalweg, der durch die konstitutiv aktiven TSHR und die hohen intrazellulären cAMP-Spiegel alteriert werden könnte, ist der Epac/Rap1 Signalweg. Da Rap1 in den mTSHR Zelllinien verstärkt exprimiert wurde und der Epac/Rap1 Signalweg ebenfalls einen Einfluss auf die Akt Phosphorylierung haben kann, wurde die Akt Phosphorylierung nach Ko-Stimulation mit dem Epac-selektiven cAMP Analogon 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-pCTP) untersucht. Diese Ko-Stimulation verringerte die Akt Phosphorylierung in allen Zelllinien, wobei gezeigt wurde, dass eine solche hemmende Wirkung zeitbegrenzt sein kann. Demzufolge ist von einer Interaktion zwischen den zwei Signalwegen Epac/Rap und PI3K/Akt auszugehen.

Zusammenfassend lassen sich folgende Schlussfolgerungen ableiten: Es wurde eine gesteigerte Endozytose in den mTSHR-SD-Zellen beobachtet. Unter dem Aspekt, dass die Rezeptorsignalisierung nach der Internalisierung erhalten bleibt, hat die gesteigerte Endozytose möglicherweise eine signifikante Funktion bei der konstitutiven Aktivierung der cAMP-Kaskade. Noch weiter zu untersuchen gilt es, welcher kausale Zusammenhang zwischen der Rab-vermittelten Endozytose und der Ras-Signalisierung besteht. Die PI3K-Akt Signalkaskade wird in mTSHR-SD-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen PKA-unabhängig verstärkt aktiviert. Dies geschieht möglicherweise durch die Epac-vermittelte cAMP-Aktivierung von Rap, was in Zusammenhang mit der konstitutiv-aktiven cAMP-Signalisierung in mTSHR-Zellen stehen kann.

Ungeklärt bleibt die Frage, wie sich die unterschiedlichen Signalisierungen der drei Zellklone auf zelluläre Prozesse wie Zellwachstum und -differenzierung auswirken, bzw. welche Unterschiede dadurch im Phänotyp der drei Mutationen entstehen. Die Mechanismen der biologischen Aktivität der mTSHR sind komplex und bis auf weiteres nicht vollständig verstanden. Es gilt in zukünftigen Untersuchungen diese Kenntnisse zu erweitern, in der Hoffnung, ein besseres Verständnis für den Verlauf der Schilddrüsenautonomie zu erreichen um hieraus gegebenenfalls auch neue Therapieverfahren entwickeln zu können.

7. Anlagen

7.1 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Datum

Unterschrift

7.2 Danksagung

Die vorliegende Promotionsarbeit entstand an der Klinik für Endokrinologie und Nephrologie der Universität Leipzig.

Ich möchte mich an dieser Stelle vor allem bei Frau Prof. Dr. Dr. med. Dagmar Führer für die Überlassung des Themas bedanken. Trotz einiger Unterbrechungen die während des Verfassens der Arbeit entstanden sind, war sie für mich immer erreichbar und hat mir durch klare und konkrete Ratschläge geholfen, die Dissertation in die Endfassung zu bringen. Gleichzeitig hat sie mir den Freiraum gegeben, Ideen nach eigenen Vorstellungen zu formulieren. Weiterhin möchte ich Frau Dr. rer. nat. Kerstin Krause für ihre fachliche Unterstützung und Geduld an dieser Stelle ganz herzlich danken - und ferner dafür, dass sie die Entstehung dieser Arbeit möglich machte. Ebenso gebührt mein Dank den technischen Mitarbeitern Frau Monika Gutknecht und Frau Beate Jeßnitzer für ihre hohe fachliche Kompetenz in vielen Gesprächen und ihrer Freundlichkeit.

Anschließend möchte ich meinem Mann Carsten Stephan und meinen Freunden und Fachkollegen Cornelia Junge, Corina Barbu und Martin Gericke ein großes Dankeschön aussprechen. Sie haben mich immer wieder über die Zeit ermuntert und unterstützt.

Danke möchte ich auch meiner Großmutter sagen, die mir geholfen hat, die Welt zu entdecken.

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Stephan, Alexandra-Ana, geboren Boisdard
Geburtsdaten: 13. November 1984, Bukarest (Rumänien)
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder
Nationalität: Deutsche und rumänische Staatsbürgerin

Schulische und universitäre Ausbildung

2010: 2. Ärztliche Prüfung
2006: Fortsetzung des Studiums der Humanmedizin an der Universität Leipzig
2005 - 2006: Teilnahme Erasmus-Programm an der Universität Leipzig
2003: Aufnahmeprüfung an der „Carol Davila“ Medizin-Hochschule in Bukarest; Beginn des Studiums der Humanmedizin
2003: Abitur
1999 - 2003: Besuch des Lyceums (Gymnasium) für Informatik „Tudor Vianu“ in Bukarest
1991 - 1999: Besuch der Grundschule in Bukarest

Klinische Tätigkeiten

- 02/2015 - 07/2016 Mutterschutz und Elternzeit
- 07/2012 - 12/2014: Assistenzärztin in der Klinik für Innere Medizin II am Krankenhaus St. Georg, Leipzig
- 10/2010 - 07/2013: Assistenzärztin in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Uniklinikums Leipzig (Unterbrechung durch Mutterschutz und Elternzeit)
- 2009: Praktisches Jahr an mehreren Kliniken absolviert

Forschungstätigkeit

- 2008: Freisemester aufgrund des Beginns der Dissertation an der Medizinische Klinik und Poliklinik III/ Abteilung Endokrinologie/ Diabetologie der Universitätsklinikum Leipzig bei Prof. Dr. Dr. Dagmar Führer-Sakel
- 2008: Promotionsförderung im Rahmen der Nachwuchsförderung der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig – „formel.1“-Programm

Publikation:

Krause K, **Boisnard A**, Ihling C, Ludgate M, Eszlinger M, Krohn K, Sinz A, Fuhrer D (2012). Comparative proteomic analysis to dissect differences in signal transduction in activating TSH receptor mutations in the thyroid. Int J Biochem Cell Biol. 44: 290-301

Datum

Unterschrift